

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ
(РОСПАТЕНТ)



**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995
Телефон 240 60 15. Телекс 114818 ПДЧ. Факс 243 33 37

Наш № 20/12-155

«16» марта 2004 г.

СПРАВКА

Федеральный институт промышленной собственности (далее – Институт) настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы, реферата и чертежей (если имеются) заявки № 2001120905 на выдачу патента на изобретение, поданной в Институт в июле месяце 25 дня 2001 года (25.07.2001).

Название изобретения:

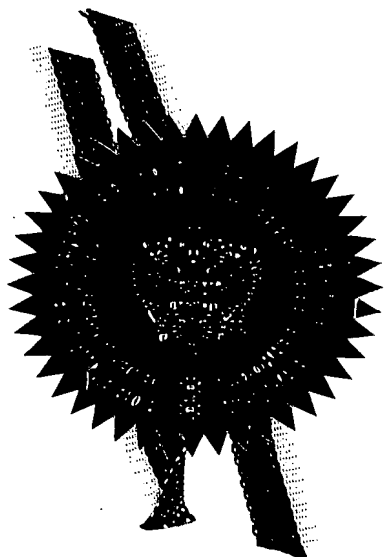
Способ приготовления и состав композиций
для иммобилизации биологических макромо-
лекул в гидрогелях и его применение для из-
готовления биочипов

Заявитель:

Институт молекулярной биологии им. В.А.Эн-
гельгардта Российской Академии Наук

Действительные авторы:

МИРЗАБЕКОВ Андрей Дарьевич
РУБИНА Алла Юрьевна
ПАНЬКОВ Сергей Васильевич
ПЕРОВ Александр Николаевич
ЧУПЕЕВА Валентина Владимировна



**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

Заведующий отделом 20

А.Л.Журавлев

**СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И СОСТАВ КОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ
ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ В
ГИДРОГЕЛЯХ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ БИОЧИПОВ**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области молекулярной биологии и биоорганической химии и касается композиций для иммобилизации модифицированных олигонуклеотидов, белков, нуклеиновых кислот или любых других молекул, несущих ненасыщенные группы, в гидрогеле при изготовлении микрочипов методом фотоиндуцируемой сополимеризации. Изобретение также относится к технологии изготовления микрочипов и проведению полимеразной цепной реакции (ПЦР) на чипе, находящих применение в молекулярной биологии при секвенировании и картрировании ДНК, детектировании мутаций и целого ряда медицинских приложений.

Уровень техники

Известны публикации по иммобилизации модифицированных олигонуклеотидов и белков в акриламидном геле при изготовлении биочипов методом сополимеризации [1,2].

[1] F. N. Rehman, M. Audeh, E. S. Abrams, P. W. Hammond, M. Kenney and T. C. Boles, Nucleic Acids Research, 1999, V.27, N 15, P. 649-655.

[2] Vasiliskov A.V., Timofeev E.N., Surzhikov S.A., Drobyshev A.L., Shick V.V., Mirzabekov A.D., BioTechniques 1999, 27, P. 592-606.

Композиции, которые использовались в этих работах для изготовления олигонуклеотидных и белковых микрочипов, условно можно разделить на

следующие составляющие:

- *Мономеры, составляющие основу формируемого геля:*

В качестве гелеобразующей основы были использованы смеси акриламида и N,N'-метиленабисакриламида с общим содержанием T = 5%, C=5% (19:1)[2] и T=10%, C= 3,3% (29:1)[1].

- *Модифицированные олигонуклеотиды и белки, несущие ненасыщенные группы.*

Предложены методы синтеза модифицированных олигонуклеотидов и белков, несущих метакриламидную [1], акриламидную [2] и аллильную [2] группы.

- *Среда проведения фотоиндуцируемой полимеризации.*

Для формирования гидрогеля использовались водно-глицериновые растворы в соотношении 60:40 [2] и 25:75[1] соответственно.

Технология иммобилизации биологических макромолекул в гидрогелях находит практическое применение; в частности, при изготовлении биологических микрочипов (биочипов) (Khrapko et al., US Patent №5552270; Ershov et al., US Patent №5770721), рассматриваемых в настоящее время в качестве одного из наиболее перспективных аналитических инструментов в таких областях, как изучение структуры ДНК в молекулярной биологии, генная медицинская диагностика, мониторинг патогенных микроорганизмов и др. В таких чипах макромолекулы, играющие роль молекулярных зондов, иммобилизуются в ячейках гидрогеля, закрепленных на общей подложке и образующих регулярную структуру (матрицу).

Известны способы изготовления биочипов на основе гидрогелей, в которых технологический цикл состоит из этапов: (1) подготовки подложки, (2) формирования на ней матрицы ячеек геля, (3) нанесения на ячейки растворов биологических макромолекул в соответствии с заранее составленной схемой

биочипа, (4) химической обработки ячеек с целью иммобилизации молекул-зондов, (5) отмывки и просушки полученных биочипов. Для формирования матрицы ячеек геля предложены метод лазерной абляции расположенного под сплошным слоем геля специального светопоглощающего слоя с геометрией, дополнительной по отношению к заданной геометрии массива ячеек (Ershov et al., US Patent № 5770721), а также метод фотополимеризации через маску (Guschin et al., Manual manufacturing of Oligonucleotide, DNA, and Protein Microchips, Analytical Biochemistry, 1997, Vol. 250, No. 2, pp. 203 – 211).

Указанные способы технически сложны и используют процедуры, не обеспечивающие необходимой однородности и воспроизводимости свойств гелевых ячеек и плохо поддающихся автоматизации.

Предложены также способы приготовления биочипов на основе геля, в котором стадии формирования массива ячеек и иммобилизации молекул-зондов объединены в одну за счет использования техники фото- или химически индуцируемой сополимеризации [1,2]. Суть их состоит в использовании полимеризационных смесей, в состав которых наряду с мономером и сшивкой входят иммобилизуемые макромолекулы, снабженные непределельной группой, обеспечивающей встраивание этих молекул в полимерную сетку гидрогеля.

Согласно протоколу приготовления биочипов, описанному в работе [1], ячейки чипа получают полимеризацией капель указанной смеси, нанесенных на подложку с помощью микропипетки.

В работе [2] для получения чипа используется специальная тонкеслойная (≈ 5 мкм) камера с реакционным объемом, ограниченным с одной стороны подложкой будущего чипа, а с другой – окном, прозрачным в УФ области. Ячейки

биочипа формируются одна за другой путем циклического выполнения следующих операций: (1) заполнения камеры смесью с соответствующим зондом, (2) полимеризации смеси в месте нахождения будущей ячейки УФ излучением, сфокусированным в квадратное пятно необходимого размера, (3) промывки камеры перед заполнением ее очередным раствором.

Очевидно, что рассмотренные варианты технологии сополимеризации также мало пригодны для автоматизации изготовления биочипов. Они имеют также и ряд недостатков с точки зрения химии иммобилизации:

1. Использование только акриламида и N,N'-метиленабисакриламида при изготовлении гелей сильно ограничивает спектр получаемых гидрогелей по структуре и пористости.

2. Предложенный авторами в работе [1] метод получения модифицированных олигонуклеотидов позволяет получать только 5'-концевую метакриламидную группу, связанную с молекулой олигонуклеотида кислотолабильной фосфоамидной связью [3-5].

[3] N. N. Preobrazhenskaya, Russ.Chem. Rev., 1972, 41, P.54;

[4] Chanley J.D., Feageson E., J.Am.Chem.Soc., 1965, 87, P.3199;

[5] Clark V.M., Kirby G.W., Todd A.R., J Chem.Soc., 1957, P.1497.

3. В работе [2] проблема кислотолабильности терминальной группы преодолена, однако предложенная авторами аллильная терминальная группа вводимая в молекулу олигонуклеотида обладает низким сродством к акриlamиду и бисакриlamиду в реакции сополимеризации.

4. Для иммобилизации белков в работе [2] предложен двухстадийный метод модификации позволяющий вводить неопределенную группу только по NH₂-группам.

Предлагаемая в работе [1] атмосфера влажного азота для проведения химической полимеризации элементов микрочипа снижает эффективность полимеризации.

Использование в работе [2] для проведения фотоиндуцируемой полимеризации источника УФ-излучения с длиной волны 254 нм приводит к деструкции олигонуклеотидов [6].

[6] Saito I., Sugiyama H., Furukawa N. & Matsuura T., Tetrahedron Lett., 1981, 22, 3265-3268.

Краткое описание рисунков

Рис.1 Иммобилизация олигонуклеотидов с 5'-терминальной ненасыщенной группой на модифицированном стекле. Композиции

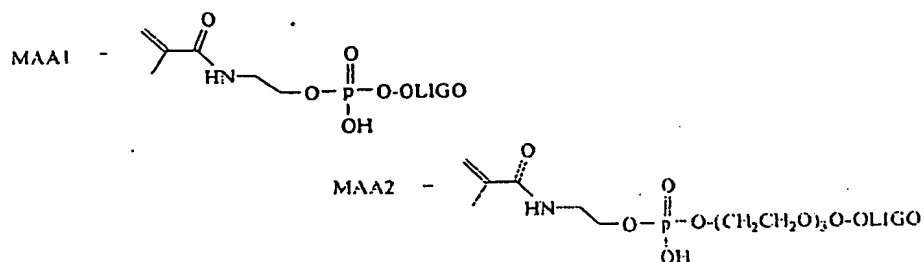
А акриламид: N,N'- метиленбисакриламид-Т10%, С5%; глицерин-64.5%

В акриламид: N,N'- метиленбисакриламид-Т5%, С5%; глицерин-64.5%

С (акриламид+N-[трис(гидрокси метил)метил]акриламид(1:3)):

(N,N'-метиленбисакриламид+N,N'-(1,2- дигидроксиэтилакриламид)) (3:7),

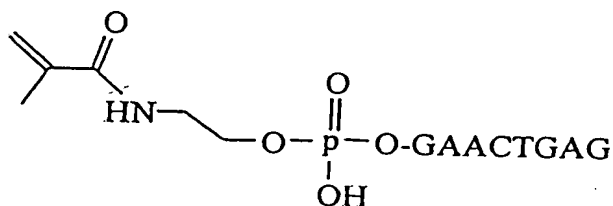
Т5%, С25%; глицерин-64.5% содержащие олигонуклеотиды



с 5'- терминальной метакриламидной группой ($C=130\text{pmol}/\mu\text{l}$) полимеризовались под действием УФ излучения на модифицированном стекле. Имобилизованные олигонуклеотиды гибридизовались с флуоресцентно меченной олигонуклеотидной пробой ($1\mu\text{M}$, 1M NaCl). Флуоресцентная картина получена с помощью флуоресцентного микроскопа.

Рис. 2. Термодинамический анализ 8-мерных дуплексов.

Имобилизованный олигонуклеотид ($C=130\text{pmol}/\mu\text{l}$):



гибридизованный флуоресцентно меченный олигонуклеотид: 5'- CTCAGNNC-Tex-Red ($1\mu\text{M}$, 1M NaCl). Композиции:

А акриламид: N,N'- метиленбисакриламид-T10%, C5%; глицерин-64.5%

В акриламид: N,N'- метиленбисакриламид-T5%, C5%; глицерин-64.5%

С (акриламид+N-[трис(гидроксиметил)метил]акриламид(1:3)):

(N,N'-метиленбисакриламид+N,N'-(1,2- дигидроксиэтилакриламид)) (3:7),

T5%, C25%; глицерин-64.5% содержащие олигонуклеотиды

Рис.3. Иммуобилизация белка в гидрогеле через модифицированные аминогруппы.

Модифицированный белок Barnase с введенными непредельными группами от 1 до 9 на молекулу белка, был иммуобилизован методом фотоиндуцированной сополимеризации под действием УФ излучения 312 нм на модифицированном Bind Silane стекле. Концентрация белка в гелевых элементах микрочипа составляла 0,09 мг/мл. Состав полимеризационной смеси соответствовал: T5%, C25%; (акриламид+N-[трис(гидроксиметил) метил]акриламид(1:3)): (N,N'-метиленибисакриламид+N,N'-(1,2-дигидроксиэтилакриламид))(3:7), глицерин-64.5%.

Связывание с флуоресцентномеченным ингибитором Barstar проводили в солевом 0,1M NaCl 0.01M фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 0.1% Tween 20, концентрация Barstar –0,1 мг/мл, при 5°C, 8 часов. Оценка влияния количества введенных групп на сохранение ферментативной активности иммуобилизованного белка проводили по величине флуоресцентного сигнала, полученного с помощью флуоресцентного микроскопа.

S1 - гель без белка

S2 - тотально модифицированный белок, (9 групп)

S3 - 5 групп, S4 – 1 группа

Рис.4. Иммуобилизация фрагментов ДНК в акриламидном геле (акриламид-N, N'- метиленибисакриламид-T5%, C5%), несущих терминальную ненасыщенную группу.

А. Гибридизация иммуобилизованных олигонуклеотидов

ABL65 5'- CAGTCTGGAGAAACACTCCTGGTAC-3',

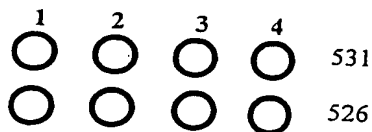
несущих или не несущих терминальную группу МАА, и неспецифического олигонуклеотида *olige 509* с пробой, меченной FITC (*probe ABL67*). Олигонуклеотид *ABL67* комплиментарен олигонуклеотиду *ABL65*.

В. Окрашивание SYBR II Green фрагмента гена ABL человека, иммобилизованного на стекле (*ABL DNA*). Фрагмент ДНК был получен ПЦР амплификацией кДНК со специфическими праймерами к гену ABL. Продукт длиной 334 пар оснований (233-566 начиная от старта транскрипции) был обработан ангидридом метакриловой кислоты и иммобилизован на стекло. Окрашивание производилось по рекомендованной производителем методике.

С. Гибридизация того же иммобилизованного фрагмента с пробой, меченной FITC (*probe 67*).

Рис.5. Детекция мутаций в 526 и 531 кодонах гена, кодирующего РНК-полимеразу *M...tuberculosis*, с помощью ПЦР на микрочипе, полученном с помощью кополимеризации. Три независимых опыта были проведены, используя в качестве исследуемой ДНК геномную ДНК *M.tuberculosis* дикого типа или ДНК, содержащую известную мутацию (Trp531 или Asp526).

Схема чипа



Структура олигонуклеотидов, иммобилизованных на микрочипе методом кополиметизации

531 кодон

- 1.leu 531 GGTGACCCACAAGCGCCGACTGTT
- 2. cys531 GGTGACCCAtAAGCGCCGACTGTGT
- 3. trp531 GGTGACC^aACAAGCGCCGACTGTGG
- 4. ser531 GGTGACCCACAAGCGCCGACTGTC (дикий тип)

526 кодон

- 1.Asn526 CCAGAACAAC^aCGCTGTCGGGGTTGACCA
- 2.Tyr526 CCAGAACAAC^aCGCTGTCGGGGTTGACCT
- 3.Asp526 CCAGAACAACCCGCTGTCGtGGTTGACCG
- 4.His CCAGAACAACCCGCTGTCGGtGTTGACCC (дикий тип)

Структура олигонуклеотидов, используемых в растворе

F (прямой): 5'-NH₂-GGT-CGC-CGC-GAT-CAA-GGA-GT-3'

R (обратный): 5'- NH₂-CGG-CAC-GCT-CAC -GTG-ACA-GA-3'

Рис.6. Демонстрация аллелеспецифического удлинения иммобилизованных праймеров в результате ПЦР, проведенного внутри гелевых ячеек микрочипа под минеральным маслом. В качестве исследуемой ДНК использовалась геномная ДНК штамма дикого типа *M.tuberculosis*. В нижней части рисунка представлены относительные количественные данные об интенсивности флуоресценции (как следствие гибридизации флуоресцентно меченой ассиметричной ПЦР-цепи с удлинённым в результате ПЦР иммобилизованным праймером) в ячейках с

полностью комплиментарным исследуемой ДНК праймером (wt) и в ячейках с мутантным праймером (mut).

Структура олигонуклеотидов иммобилизованных на микрочипе методом кополиметизации

C4: CCAGAACAACCCGCTGTCGGtGTTGACCC (дикий тип)

C5: CCAGAACAACaCGCTGTCGGGGTTGACCT (Tyr526)

Сущность изобретения

Сущность изобретения заключается в том, что олигонуклеотиды, нуклеиновые кислоты, протеины или любые другие биологические макромолекулы модифицируются различными неопределёнными группами, имеющими высокое сродство с неопределённым мономером, составляющим основу формируемого гидрогеля (например, акриламидом, метакриламидом или любым другим мономером на их основе), позволяющими проводить эффективную иммобилизацию полученных модифицированных олигонуклеотидов в геле непосредственно в процессе его приготовления. В частности, указанный способ иммобилизации лег в основу предлагаемого авторами способа приготовления биологических микрочипов на основе гидрогелей, являющегося составной частью данного изобретения.

Согласно предлагаемому авторами способу иммобилизации биологических макромолекул в гидрогелях, для приготовления последних используются композиции следующего состава:

$$K = A^a + B^b + C^c + D^d + E^e$$

Здесь:

K- композиция;

A- акриламид, метакриламид, N-{трис(гидроксиметил)метил}-акриламид, или

другой мономер на основе производных акриловой и метакриловой кислот;

В- N,N'-метиленабисакриламид, N,N'-1,2-дигидрокси-этилбисакриламид, полиэтиленгликольдиакрилат, их смесь или другой симметричный или несимметричный водорастворимый сшивающий агент на основе производных акриловой и метакриловой кислот;

С- модифицированный олигонуклеотид, модифицированная нуклеиновая кислота, протеин или другая молекула, несущая ненасыщенную группу;

Д- глицерин, сахароза, диметилформамид, диметилсульфоксид, полиспирты (например поливиниловый спирт) или другое водорастворимое высококипящее соединение;

Е- вода;

a,b,c,d,e-процентное содержание каждого компонента в композиции ($X = m/v \times 100\%$, для твердых веществ, или $X = v/v \times 100\%$ для жидких веществ).

$3\% \leq a+b \leq 40\%$; $0.0001\% \leq c \leq 10\%$; $0\% \leq d \leq 90\%$; $5\% \leq e \leq 95\%$.

Наряду с гелями иного назначения, указанные выше композиции предлагается использовать для изготовления олигонуклеотидных, белковых и ДНК(РНК) микрочипов методом фотоиндуцируемой сополимеризации по описываемой ниже технологии.

В заявленных композициях, для изготовления олигонуклеотидных, белковых, ДНК(РНК) чипов предлагается использовать следующие компоненты:

- Мономеры, составляющие основу формируемого геля.

В качестве мономеров гелеобразования предлагаются различные сочетания акриламида, метакриламида, N-{трис(гидроксиметил)-метил}акриламид, N,N'-

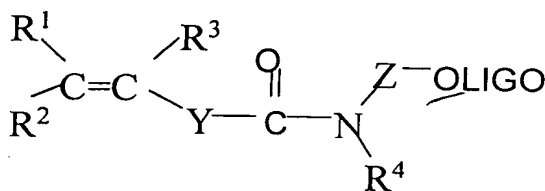
метиленбисакриламида, N,N'-1,2-дигидрокси-этилбисакриламида или любого другого водорастворимого мономера на основе производных акриловой и метакриловой кислот. При этом общее содержание мономера и сшивающего агента в композиции лежит в интервале 3-40% ($3 < T < 40$), а соотношение мономера и сшивающего агента находится в пределах 97:3-60:40% ($3 < C < 40$).

Различные сочетания и соотношения мономеров позволяют получать гидрогели, с заданной величиной пор.

- Модифицированные олигонуклеотиды, белки, нуклеиновые кислоты, несущие в своей структуре остатки непредельных кислот.

Способы модификации олигонуклеотидов

Для изготовления олигонуклеотидных микрочипов нами предлагаются синтетические олигонуклеотиды общей формулы:



I

где:

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$ - H, алкил $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, PhCH_2 - ;

Z - $(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2\text{OX}$, где $n = 1-6$; или $(\text{CH}_2)_n\text{-OX}$, где $n = 2-6$;

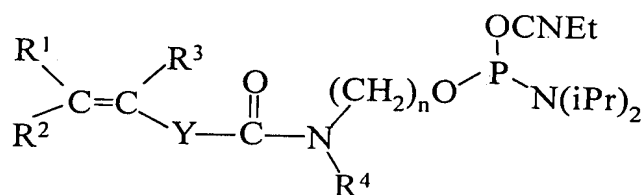
X - Фосфодиэфирная группа, связывающая непредельный фрагмент с 5'-и/или 3'-концом олигонуклеотида.

R^4 - H, $(\text{CH}_2)_n\text{OH}$, где $n = 2-6$;

Y - (p-C₆H₄)_n, где n= 0-2;

которые получают с помощью соответствующего фосфоамидитного твердофазного синтеза или ацилирования синтезированного олигонуклеотида, содержащего аминолинк, активированным эфиром непердельной кислоты в поставтоматическом режиме.

- В автоматическом режиме введение непердельных соединений в синтетический олигонуклеотид осуществляется с помощью соответствующего фосфоамидита. В общем случае для модификации олигонуклеотидов нами предлагаются фосфоамидиты формулы :



II

где:

R¹, R² - H, алкил C₁-C₆, Ph, PhCH₂-, где n=2-6 ;

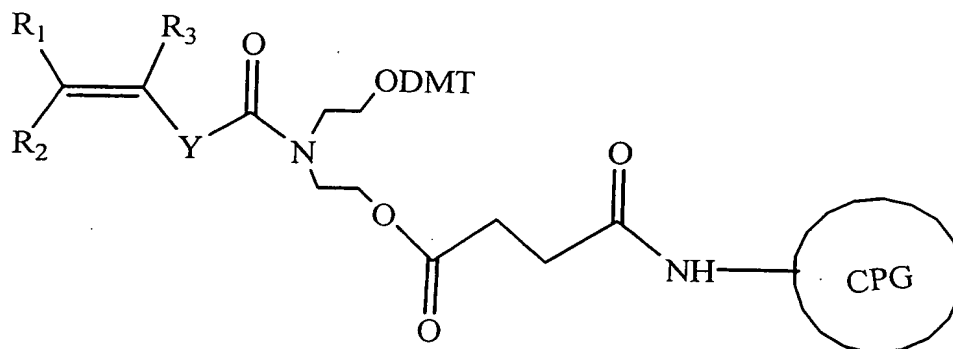
R³ - алкил C₁-C₆;

R⁴ - H, (CH₂)_n-ОДМТ, где n= 2-6;

Y - (p-C₆H₄)_n, где n= 0-2;

В примере 1 представлена методика синтеза 2-(N-метакриламиноэтил)-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидита.

Для введения остатка непердельной кислоты по 3'- концу олигонуклеотидов в условиях автоматического синтеза олигонуклеотидов нами предлагаются СРГ следующего строения:



III

где:

R^1, R^2 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

R^3 - алкил C_1-C_6 ;

Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n = 0-2$;

Данное модифицированное стекло (CPG) используется в стандартных условиях автоматического синтеза олигонуклеотидов.

В примере 2 приведена методика синтеза methacrylamide CPG-support.

- В поставтоматическом режиме введение непердельного остатка в олигонуклеотид осуществляется в результате реакции 4-нитрофенилового эфира соответствующей кислоты с синтезированным олигонуклеотидом, содержащим аминолнк, по 5'- и (или) 3'-концу. 4-Нитрофениловые эфиры непердельных кислот получают в реакции соответствующих кислот с 4-нитрофенолом в присутствии дициклогексилкарбодиимида или ангидридов (в том числе хлорангидридов) кислот в присутствии оснований.

В примере 3 приведена а общая процедура ацилирования для синтетических олигонуклеотидов с ненасыщенными группами.

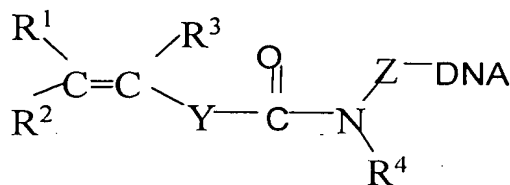
На рис. 1 приведены результаты гибридизаций на олигонуклеотидном микрочипе, где олигонуклеотид с 5'-терминальной метакриламидной группой был получен в стандартных условиях автоматического синтеза олигонуклеотидов с использованием одного из фосфоамидитов формулы (II).

Способы модификации ДНК

Для изготовления ДНК микрочипов нами предлагаются три способа модификации фрагментов ДНК для введения ненасыщенной группы в структуру молекулы:

- Использование в PCR амплификации синтетического праймера, несущего терминальную непредельную группу.

Данный метод позволяет получать двухцепочечный или одноцепочечный фрагмент ДНК следующего строения:



IV

где:

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$ - H, алкил $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, PhCH_2 - ;

Z - $(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2\text{OX}$, где $n = 1\text{-}6$; или $(\text{CH}_2)_n\text{-OX}$, где $n = 2\text{-}6$;

X - Фосфодиэфирная группа, связывающая непредельный фрагмент с концом фрагмента ДНК.

R^4 - H, $(\text{CH}_2)_n\text{OH}$, где $n = 2\text{-}6$;

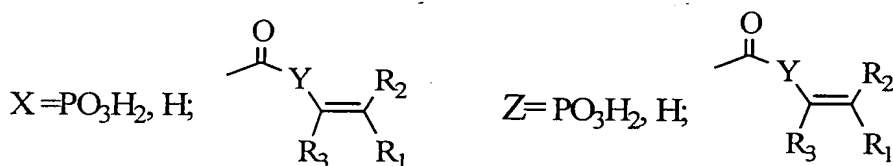
Y - (p-C₆H₄)_n, где n= 0-2;

- Прямое ацилирование фрагментов ДНК ангидридом непредельной кислоты.

Использование ангидридов непредельных кислот для ацилирования ДНК позволяет получать модифицированные фрагменты ДНК следующего строения:



V



R¹, R², R³ - H, алкил C₁-C₆, Ph, PhCH₂- ;

Y - (p-C₆H₄)_n, где n= 0-2;

Прямое ацилирование фрагментов ДНК удается проводить не затрагивая экзоциклические амино-группы оснований [7].

[7] Stuart A., Khorana H. G., J.Biol.Chem., 1964, 239, P.3885-3892.

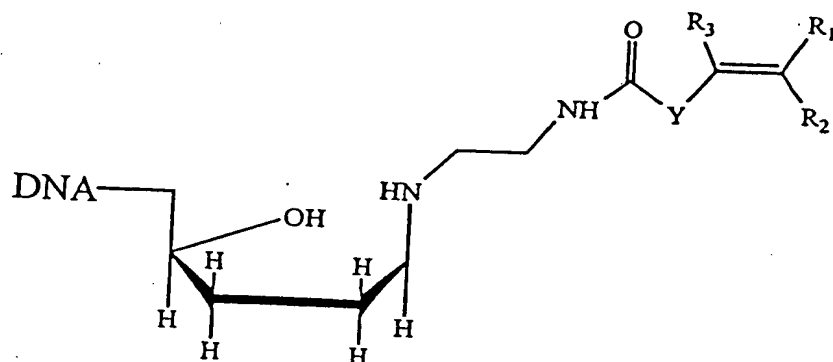
В примере 4 приведена методика О-ацилирования фрагментов ДНК ангидридами непредельных кислот.

- Аминирование ДНК с последующим ацилированием активированными эфирами ненасыщенных кислот.

Фрагмент ДНК, аминированный по методу [8], ацилируется активированными эфирами непредельных кислот в водно-органической среде.

[8] Proudnikov D, Timofeev E, Mirzabekov A., Anal Biochem. 1998, 15;259(1), P. 34-41.

Полученные фрагменты модифицированной ДНК имеют следующее строение:



VI

где:

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$ - H, алкил $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, PhCH_2 - ;

Y - $(\text{p-C}_6\text{H}_4)_n$, где $n = 0-2$;

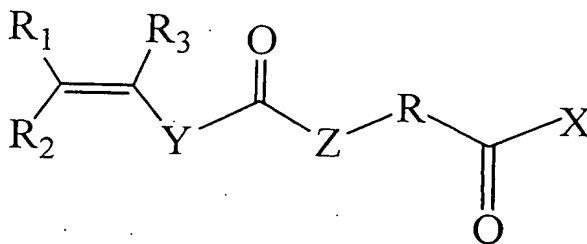
В примере 5 приведена методика аминирования ДНК с последующим ацилированием активированным эфиром непредельной кислоты.

На рис. 4 представлены результаты гибридизаций на микрочипах с иммобилизованными фрагментами ДНК.

Способы модификации белков

Модификацию белков осуществляли тремя способами:

1. Ацилирование белков по аминогруппам осуществляли активированными



эфирами кислот следующего строения:

VII

где:

R^1, R^2, R^3 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

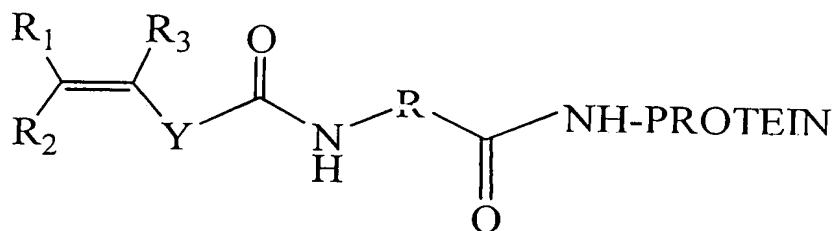
Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n = 0-2$;

R- $(CH_2)_n, (CH_2O)_n, n = 1-20$

X- N-гидроксисукцинимидил, p-нитрофенилокси, пентафторфенилокси или любая другая акцепторная хорошо уходящая группа.

Z-NH, O, CH_2 , S

Модифицированные белки имели следующее строение:



VIII

где:

R^1, R^2, R^3 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n = 0-2$;

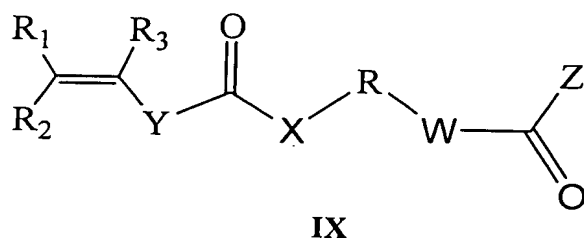
R- $(CH_2)_n, (CH_2O)_n, n = 1-20$

Z-NH, O, CH_2 , S

В примере 6 приведена методика модификации белков по амино-группе на примере белка Barnase.

На рис. 3 представлены результаты гибридизаций на микрочипах с иммобилизованным белком Barnase.

2. Алкилирование белков по сульфгидрильным и аминогруппам производными α,β -непредельных карбонильных соединений, α,β -непредельных и α -галоген карбоновых кислот производится реагентами следующего строения:



где

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$ - H, алкил $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, $\text{PhCH}_2\text{-}$;

Y - $(\text{p-C}_6\text{H}_4)_n$, где $n=0\text{-}2$;

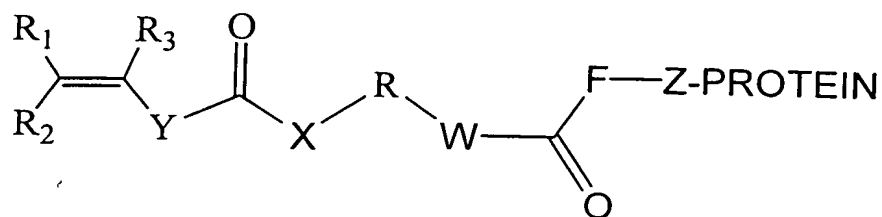
R- $(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2\text{O})_n$, $n=1\text{-}20$;

X=NH, O, S, CH_2 ;

W= NH, O, CH_2 .

Z= галогенметил, этенил, сукцинимидил или любой другой фрагмент, содержащий активную кратную связь.

Модифицированные белки имели следующее строение:



X

где

R^1, R^2, R^3 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n=0-2$;

R- $(CH_2)_n$, $(CH_2O)_n$, $n=1-20$;

X=NH, O, S, CH_2 ;

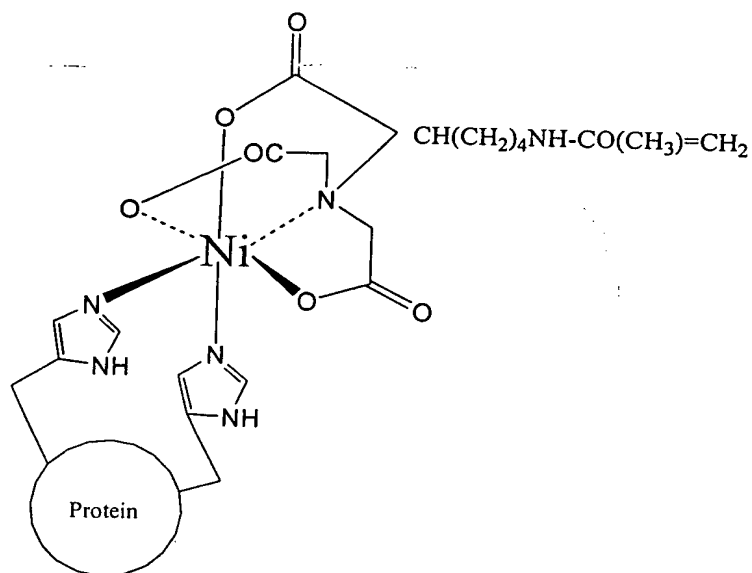
W= NH, O, CH_2 .

Z=NH, S;

F= $(CH_2)_n$, $n=1,2$

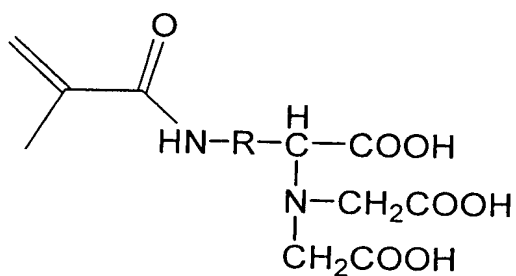
В примере 7 приведена методика алкилирования аспартат аминокотрансферазы из цитозоля печени кур 2-акрилоксиэтилметакрилатом.

3. Обработка His₆-рекомбинантных белков N-метакрилоилнитрилотриуксусной кислотой в присутствии солей никеля (Ni^{2+}) приводит к образованию комплекса следующего строения:



XI

N-Метакрилоилнитрилотриуксусная кислота имеет следующее строение:



XII

где

$R = (CH_2)_n, (CH_2CH_2O)_n, n=0-20.$

На рис. 4 приведены результаты гибридизаций на протеиновом микрочипе.

- Среда проведения фотоиндуцируемой полимеризации.

В качестве среды гелеобразования предлагаются водно-глицериновые растворы, растворы поливинилового спирта в воде, растворы сахарозы в воде, растворы диметилформамида, диметилсульфоксида или других водорастворимых и высококипящих соединений. Содержание воды в композициях гелеобразования варьируются в пределах 5%-90% (v/v), а высококипящего водорастворимого компонента 5%-95% (m/v; v/v).

Различное соотношение воды и высококипящего водорастворимого компонента позволяет получать гелевые композиции различной вязкости, позволяющие варьировать размер гелевых элементов микрочипа при фиксированном диаметре пина робота.

- Мономер, ковалентно пришитый к поверхности стекла.

Для модификации поверхности стекла с целью ковалентного ссызывания элементов чипа с поверхностью нами предлагаются следующие реагенты: 3-триметоксисилилпропилметакрилат, 3-триметоксисилилпропилметакриламид, 3-триметоксисилилпропил-акриламид, 3-глицидилоксипропилтриметоксисилан.

Такой спектр модифицирующих агентов позволяют получать чипы, которые можно использовать в широком диапазоне pH среды (2-12) и температуре (-10°C-100°C).

Различные сочетания компонентов композиций позволяют получать микрочипы, пористость элементов которых может варьироваться в широких пределах и позволяет использовать данные чипы для многих приложений, в частности для проведения PCR, для исследования взаимодействия в системах олигонуклеотид-олигонуклеотид, ДНК-олигонуклеотид, белок-белок, белок-ДНК.

Технология изготовления микрочипов с использованием метода фотоиндуцируемой полимеризации на основе предлагаемых композиций включает следующие компоненты:

- Способ подготовки композиций и подложек для изготовления микрочипа.
- Способ нанесения элементов микрочипа
- Способ выравнивания содержания воды в элементах микрочипа
- Способ инициирования полимеризации
- Способ отмывки полученного микрочипа
- Способ хранения композиций.

При подготовке композиций для изготовления чипа все компоненты смешиваются и при тщательном перемешивании получается гомогенный раствор, который дегазируется в вакууме ($p=12$ мм рт.ст) и раскапывается в микротитровальные планшеты, используемые далее в качестве источника растворов при нанесении на подложку (подложки) с помощью автоматического устройства (робота), снабженного одним или несколькими микродиспенсерами.

Ниже способ приготовления биочипов описывается для случая, когда в качестве подложек используются стандартные препаратные стекла. Понятно, однако, что это не ограничивает сферу применения предлагаемых способов иммобилизации макромолекул и приготовления биочипов, поскольку описываемые ниже приемы могут быть легко адаптированы для подложек иных типов, например, кварцевых, из оксидированного кремния и т.д.

Подготовка стекла для нанесения композиции для полимеризации включает стадию очистки стекла последовательной обработкой концентрированной щелочью, кислотой и стадию химической модификации стекла с помощью растворов 3-

триметоксисилилпропил-метакрилата, 3-триметоксисилилпропилметакриламида, 3-триметокси-силилпропилакриламида, 3-глицидилоксипропилтриметоксисилана в органических растворителях.

Формирование структуры массива ячеек биочипа осуществляется путем нанесения на подготовленную подложку регулярного массива микрокапель полимеризационной композиции. При этом в общем случае каждая микрокапля содержит макромолекулы своего типа. В зависимости от вязкости и других свойств полимеризационных композиций, а также от желательного размера ячеек биочипа для нанесения могут использоваться роботы с микродиспенсерами разных типов. В частности, в случае вязких растворов с содержанием глицерина свыше 40% для этих целей может быть использован робот «417 Аггауег» производства фирмы Affymetrix (США), снабженный микродиспенсерами стержневого (игольчатого) типа. При этом в зависимости от диаметра стержня диспенсера возможно получение капель (и, следовательно, гелевых ячеек) разного размера.

Поскольку при формировании массива капли наносятся последовательно, различие в продолжительности их контакта с окружающим воздухом приводит к тому, что к моменту завершения нанесения капли различаются по составу вследствие, в первую очередь, абсорбции/десорбции атмосферной влаги. Это явление приводит к неоднородности формируемого массива по размерам ячеек. Для решения данной проблемы, после нанесения биочипы помещаются в герметичный контейнер, содержащий полимеризационную композицию, аналогичную по составу тем, что были использованы при нанесении, но не содержащую биологических макромолекул. Объем этой смеси должен превосходить совокупный объем нанесенных микрокапель по крайней мере в два раза. Время инкубации биочипов в контейнере как правило составляет не менее двух часов.

Затем микрочипы проходят стадию насыщения осушенным инертным газом (азот, аргон, углекислый газ и т.д.).

Инициирование процесса полимеризации осуществляется ультрафиолетовым светом с $\lambda \geq 312$ нм в атмосфере инертного газа.

Полученные микрочипы отмываются в дистиллированной воде при 60°C в течении 5 часов высушиваются на воздухе ($T=25^\circ\text{C}$).

Приготовленные смеси для полимеризации хранятся при $T=-21^\circ\text{C}$ не менее 1 года.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) на чипе

Одним из важнейших применений описываемой технологии (иммобилизации олигонуклеотидов в геле методом кополимеризации) является производство олигонуклеотидных биочипов. Полученные чипы были использованы как в гибридизационных экспериментах, так и для проведения более сложных процедур, таких, например, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) на чипе. Ниже приведены демонстрационные примеры применения ПЦР на чипе (как в случае, когда ПЦР-раствор покрывает гелевые ячейки чипа, так и в случае, когда ПЦР происходит только внутри гелевых ячеек, изолированных друг от друга и окружённых минеральным маслом).

ПЦР на чипе также использовалась для суммарной характеристики сополимеризационных гелевых элементов чипа разного состава и для выбора оптимального способа их приготовления. Быстрота диффузии ДНК фрагментов размером 140 нуклеотидов (пористость геля), стабильность ячеек в широком диапазоне быстро меняющихся температур, доступность и эффективность участия

иммобилизационного олигонуклеотида в гибридизации и аллелеспецифичной полимеразной реакции его удлинения суть основные факторы влияющие на результат ПЦР-анализа на чипе.

В примере 8 приведена методика проведения ПЦР на чипе.

На рис. 5, 6 приведены результаты ПЦР-анализа на чипе.

Далее сущность изобретения раскрывается на отдельных примерах, которые не должны рассматриваться экспертом как ограничивающие притязания изобретения.

Примеры

Пример 1. Синтез 2-(N-метакриламиноэтил)-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидита.

4-Нитрофенилметакрилат. К раствору метакриловой кислоты (1.015 г, 11.79 ммоль) и 4-нитрофенола (1.804 г, 12.98 ммоль) в EtOAc (14 мл) при 0°C добавляют раствор 1,3-дициклогексилкарбодиимида (2.68 г, 12.98 ммоль) в EtOAc (7 мл) и полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 часов. Суспензию фильтруют через стеклянный фильтр. Фильтрат упаривают под вакуумом до объема 10 мл и охлаждают до -50°C. Выпавший осадок быстро фильтруют через стеклянный фильтр и высушивают под вакуумом.

(Выход= 2.12г, 87%), $R_f=0.86$ (Ацетон:петролейный эфир =3:2); $T_{пл}$. 94-95°C;

1H ЯМР (DMSO- d_6) δ 2.10(s, 3H, CH₃), 5.95(s, 1H, CH₂=), 6.33(s, 1H, CH₂=), 7.50(apparent d, J=9.0Hz, 2H, C₆H₄), 8.31(apparent d, J=9.15Hz, 2H, C₆H₄).

^{13}C ЯМР (DMSO- d_6) δ 18.85(CH_3), 124.16, 126.20, 145.98, 156.43(C_6H_4), 129.67, 135.72 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 165.51($-\text{COO}-$).

Рассчитано для $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_4$: C, 57.97%; H, 4.35%;

Найдено: C, 57.99%; H, 4.50%.

N-(2-Гидроксиэтил)метакриламид. К раствору 4-нитрофенилметакрилата (5.00 г, 24.15 ммоль) в CH_3CN (40 мл) при 0°C добавляют раствор этаноламина (2.94 г, 48.30 ммоль) в CH_3CN (40 мл) и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 часов. Суспензию фильтруют через стеклянный фильтр. Фильтрат упаривают под вакуумом. Осадок очищают с помощью колоночной флеш-хроматографии на силикагеле (ацетон:петролейный эфир=3:2). (Выход=2.804 г, 90%);

$R_f=0.41$ (ацетон:петролейный эфир=3:2); светло-желтое масло;

^1H ЯМР (DMSO- d_6) δ 1.85(s, 3H, CH_3), 3.17(apparent q, $J=5.92\text{Hz}$ 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$), 3.42(apparent q, $J=5.91\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{O}-$), 4.55(t, $J=5.29\text{Hz}$ 1H, OH), 5.26(apparent s, 1H, $-\text{CH}=\text{C}-$); 5.65(apparent s, 1H, $-\text{CH}=\text{C}-$); 7.75(br s, 1H, $-\text{NH}-$).

^{13}C ЯМР (DMSO- d_6) δ 19.61(CH_3), 42.74($-\text{N}-\text{CH}_2-$), 60.75($-\text{CH}_2-\text{O}-$), 119.67, 140.85 ($\text{CH}_2=\text{C}-$), 168.34($-\text{COO}-$).

Рассчитано для $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$: C, 55.81%; H, 8.53%;

Найдено: C, 55.87%; H, 8.64%.

2-(N-Метакриламиноэтил)-N,N'-диизопропил-2-цианозтилфосфорамидит.
К раствору N-(2-гидроксиэтил)метакриламида (0.1 ммоль) в ацетонитриле (0.25 мл) и 2-цианозтил-N,N'-тетраизопропилфосфорамидита (0.095 ммоль) добавляют

раствор тетразола (0.095 ммоль) в ацетонитриле (0.25 мл). Смесь перемешивают при комнатной температуре 30 мин. Выпавший осадок фильтруют и фильтрат без очистки используют в твердофазном синтезе олигонуклеотидов.

Пример 2. Синтез метакриламид CPG-носителя.

К раствору N-(2-гидроксиэтил)-N-(2-(ди(4-метоксифенил)-фенил)-метил-окси)-этил)метакриламида (0.143 г, 0.3 ммоль) в сухом пиридине (3 мл) добавляют ^{DMAP}янтарный ангидрид (0.060 г, 0.3 ммоль) и 4-(N,N-диметиламино)пиридин (0.037 г, 0.3 ммоль). Смесь оставляют на 12 часов при комнатной температуре. К раствору добавляют насыщенный раствор NaHCO_3 (2 мл). Растворитель выпаривают под вакуумом. Осадок растворяют EtOAc (5 мл) и органический слой последовательно промывают насыщенным раствором NaHCO_3 , несколько раз H_2O , сушат над безводным Na_2SO_4 и фильтруют. Растворитель выпаривают до получения бесцветного сиропа. Остаток растворяют в сухом пиридине (30 мл). К раствору добавляют 2,2'-дитиодипиридин (0.060 г, 0.3 ммоль), трифенилфосфин (0.079 г, 0.3 ммоль) и LCA CPG (1.00 г). Суспензию упаривают под вакуумом до объема 15 мл и сохраняют 24 часа при комнатной температуре при редком встряхивании. Суспензию фильтруют через стеклянный фильтр и осадок последовательно промывают несколько раз сухим пиридином. К промытому осадку добавляют "кипярующий" раствор (уксусный ангидрид/ DMAP /2,6-лутидин/ацетонитрил) (10 мл) и оставляют на 5 мин. Осадок последовательно промывают несколько раз сухим пиридином, ацетоном и этиловым эфиром. Получают модифицированный CPG с концентрацией ненасыщенных групп (33.7 мкмоль/г)(тест на тритильный катион).

Пример 3. Общая процедура ацилирования при синтезе

олигонуклеотидов с ненасыщенными группами.

В качестве примера приведена методика ацилирования олигонуклеотидов с концевой алифатической амино-группой нитрофениловым эфиром метакриловой кислоты.

К раствору модифицированного олигонуклеотида, содержащего незащищенную аминогруппу на 5' (или 3')-конце (32.1 нмоль) в боратном буфере pH 9.53 (50 мкл.) добавляют раствор 4-нитрофенилметакрилата (3.2 мкмоль) в DMFA (110 мкл.).

Гомогенный раствор сохраняют при 40°C в течение ночи. Нуклеотиды разделяют гельфильтрацией на Sephadex G25 и очищают с помощью обратно-фазной HPLC. (Выход = >72%).

Пример 4. О-Ацилирование фрагментов ДНК ангидридами непредельных кислот.

Фрагмент ДНК (10 пмоль) растворяют в H₂O (50 мкл), охлаждают до 5°C и приливают раствор ангидрида метакриловой кислоты (15 мкл) в DMFA (100 мкл, а затем небольшими порциями добавляют раствор гидроксида натрия, поддерживая pH 7. После 15 минут к реакционной смеси добавляют H₂O (500 мкл) и последовательным добавлением нескольких порций безводного бутанола объем реакционной среды доводят до 50 мкл. Модифицированный фрагмент ДНК высаживают раствором перхлората лития в ацетоне (2%, V=1000 мкл) при T=-21°C. Центрифугируют и отмывают ацетоном.

Пример 5. Аминирование ДНК с последующим ацилированием

активированным эфиром неперелойной кислоты.

К раствору олигонуклеотида или фрагмента ДНК (39.3 нмоль) в H_2O (15 мкл) приливают муравьиную кислоту (80%, 20 мкл) и выдерживают при комнатной температуре 1 час. Затем олигонуклеотидный материал высаживают раствором перхлората лития в ацетоне (2%, $V=1000$ мкл), отмывают ацетоном и высушивают. К опуризированной ДНК приливают раствор 0.5М гидрохлорида этилендиамина (50 мкл, pH 7.4) и выдерживают при $T=37^{\circ}C$ 3 часа. Затем добавляют свежеприготовленный раствор боргидрида натрия в воде (15 мкл, 0.1 М) и через 30 мин раствор 20% гидрохлорида этилендиамина (14.75 мкл). Олигонуклеотидный материал высаживают раствором перхлората лития в ацетоне (2%, $V=1000$ мкл), отмывают ацетоном и высушивают. Осадок растворяют в боратном буфере (50 мкл, pH 9.3) и приливают раствор нитрофенилового эфира метакриловой кислоты (0.001 г) в DMFA (100 мкл). Раствор выдерживают 12 часов при $T=35^{\circ}C$. Модифицированный фрагмент ДНК очищают гель-фильтрацией.

Пример 6. Модификация белков по аминок-группе.

В качестве примера приведена методика модификации белка Barnase.

К 100 мкл раствора Barnase ($C=1$ мг/мл) в 0.01 М боратном буфере (pH 8,3) добавляли 20 мкл раствора сукцин-иммидного эфира 6-метакриламиногексановой кислоты ($C=0,1$ мг/мл) в диметилформамиде. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Затем проводили очистку полученного модифицированного белка от низкомолекулярных продуктов реакции и диметилформамида на микроконцентраторах Nanoser 3K Omega, промывая белок боратным буфером pH 8,3. Конечная концентрация очищенного белка в объеме 100

мкл буферного раствора составляла 0,9 мг/мл (определенная спектрофотометрически). Полученный модифицированный белок по данным MALDI-MS содержал одну введенную 6-метакрил-аминогексановую группу.

Изменение соотношения белок-модифицирующий агент позволяет получать белок с различной степени модификации.

Пример 7. Алкилирование белков по SH группам.

В качестве примера приведена методика алкилирования аспартат аминотрансферазы из цитозоля печени кур 2-акрилоксэтилметакрилатом.

К раствору аспартат аминотрансферазы (9 мкл, 3.33 мг/мл) в буфере (25 мМ HEPES, pH 8.0, 30 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂), охлажденному до 5°C приливают раствор 2-акрилокс-этилметакрилата (0.012 г, 65.2 мкмоль) в диметилформамиде (3мкл). Гомогенный раствор выдерживают 1 час, а затем модифицированный белок очищают на мембранных фильтрах. Эффективность модификации белка контролировалась электрофоретическим методом.

Модифицированный белок используют для изготовления протеиновых микрочипов.

Синтез 2-акрилоксэтилметакрилата

К раствору 2-гидроксиэтилметакрилата (1.070 г., 8.22 ммоль) и триэтиламина (0.832 г, 8.22 ммоль) в тетрагидрофуране (25 мл) добавляют при интенсивном перемешивании хлорангидрид акриловой кислоты (0.744 г., 8.22 ммоль). Перемешивают при комнатной температуре 1 час, выпавший осадок отфильтровывают, а фильтрат упаривают. К полученному маслу приливают воду (30 мл) и интенсивно встряхивают. Отделив водный слой, приливают этилацетат (15 мл)

эфирный слой высушивают над сульфатом натрия и упаривают на роторном испарителе ($p=18$ мм рт ст). Выход 81%, масло.

^1H ЯМР (DMSO-d_6) δ 1.87(s, 3H, CH_3), 3.34(m, 2H, O-CH_2), 3.37(m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O-}$), 5.68(apparent s, 1H, $\text{CH}_2=$); 6.02 (apparent s, 1H, $\text{CH}_2=$); 5.96(dd $J_1=10.26\text{Hz}$, $J_2=1.87\text{Hz}$, 1H, $\text{CH}_2=$); 6.33(dd $J_1=17.13\text{Hz}$, $J_2=1.55\text{Hz}$, 1H, $\text{CH}_2=$); 6.19(dd $J_1=17.13\text{Hz}$, $J_2=10.28\text{Hz}$, 1H, $=\text{CH-}$);

Рассчитано for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$: C, 58.70%; H, 6.52%;

Найдено: C, 58.63%; H, 6.64%.

Пример 8. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) на чипе.

Типичный *in situ* ПЦР-эксперимент проводился на чипе в специальной микрокамере как было описано ранее (Strizhkov et al., 2000). На чипе методом кополимеризации были иммобилизованы в разных ячейках олигонуклеотиды, полностью соответствующие последовательности дикого типа, или олигонуклеотиды, содержащие на 3' конце нуклеотидную замену. Стандартный ПЦР раствор (67 mM Tris-HCl, pH 8.6; 2.5 mM MgCl_2 ; 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.001% Triton X-100; 1 мг/мл BSA; 0.24 mM each of dATP, dCTP, dGTP, и dTTP; 2.5 U Taq ДНК-полимеразы на 30 мкл) содержал также около 10^5 копий геномной ДНК *Mycobacterium tuberculosis*, а также прямой F (около 1 пмоль) и меченый текасским красным по 5' концу обратный R (около 10 пмоль) праймеры. Обычно использовали 35 ПЦР-циклов: 40 сек. – 95°C, 60 сек. – 64°C, 40 сек. – 72°C. После окончания ПЦР чип промывали раствором 0.1-0.3 М хлорида натрия при 80°C, в результате чего только дуплексы с удлинённым в результате реакции праймером сохранялись на чипе и могли быть детектированы под флуоресцентным микроскопом. Пример результата одного из таких экспериментов показан на рис.5.

ПЦР внутри гелевых элементов под минеральным маслом

Специальный эксперимент был проведён для демонстрации возможности проведения всей полимеразной цепной реакции внутри индивидуального гелевого элемента, полученного методом кополимеризации. Был применён вариант ПЦР на чипе под маслом (Tillib et al., 2001). Фрагментированная (200-300 нукл.) денатурированная геномная ДНК *Mycobacterium tuberculosis* исходно использовалась для гибридизации с соответствующими олигонуклеотидами на чипе (чип тот же, что использовался в предыдущем эксперименте). Затем, после отмывки негибридовавшей ДНК, чип инкубировали со стандартным ПЦР раствором (см. выше) в течение 30 минут при 55°C. Водный раствор замещали минеральным маслом и проводили ПЦР (30 циклов): 40 сек. – 72°C, 40 сек. – 95°C, 60 сек. – 64°C. Вслед за завершающей стадией элонгации (10 мин. – 72°C) чип тщательно отмывали, сначала хлороформом и затем раствором 0.1-0.3 М хлорида натрия при 80°C, и затем анализировали под флуоресцентным микроскопом. На рисунке 2 показан результат такого эксперимента. Можно видеть, что аллелеспецифическая ПЦР реакция идёт и в этом случае достаточно эффективно в ячейках с полностью комплементарным используемой ДНК праймером (дикого типа, wt, см. ячейки с C4 праймером). Заметно слабее эта реакция прошла в ячейках с праймером, содержащим однонуклеотидную замену на 3' конце (mut, C5 праймер) (Рис. 6).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ приготовления композиций для иммобилизации биологических макромолекул: олигонуклеотидов, протеинов, ДНК(РНК) или любых других молекул, несущих ненасыщенные группы, отличающийся тем, что предлагаемые композиции имеют следующий состав:

$$A^a + B^b + C^c + D^d + E^e = K$$

где А- акриламид, метакриламид, N-{трис(гидроксиметил)метил}-акриламид, или любой другой мономер на основе производных акриловой и метакриловой кислот; В-N,N'-метиленабисакриламид, N,N'-1,2 дигидрокси-этилбисакриламид, полиэтиленгликоль-диакрилат, их смесь или другой водорастворимый сшивающий агент;

С- модифицированный олигонуклеотид, модифицированная нуклеиновая кислота, протеин или другая молекула, несущая ненасыщенную группу;

Д- глицерин, поливиниловый спирт, сахароза, диметилформамид, диметилсульфоксид или другое водорастворимое высококипящее соединение;

Е- вода;

К- композиция.

a,b,c,d,e-процентное содержание (X) каждого компонента в исходном составе композиции ($X = m/v \times 100\%$, для твердых веществ, или $X = v/v \times 100\%$ для жидких веществ).

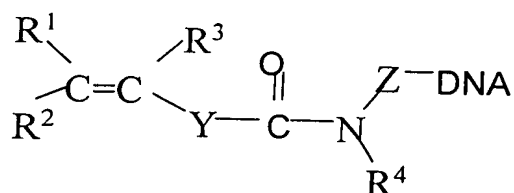
$$3\% \leq a+b \leq 40\%; 0.0001\% \leq c \leq 10\%; 0\% \leq d \leq 90\%; 5\% \leq e \leq 95\%,$$

и позволяют достигать высокую степень иммобилизации биологических

макромолекул методом сополимеризации в гидрогелях.

2. Способ по п.1, где мономеры (А, В) представляют собой акриламид, метакриламид, N-{трис(гидроксиметил)-метил}акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, N,N'-1,2-дигидроксиэтилбисакриламид, полиэтиленгликоль-диакриламид или другое водорастворимое непердельное соединение.
3. Способ по п.1, где (С) - модифицированные олигонуклеотиды, белки, нуклеиновые кислоты, или другая молекула, несущая непердельную группу.
4. Способ по п.1, где (D) - глицерин, поливиниловый спирт, сахароза или другое водорастворимое высококипящее соединение.
5. Способ по п.2, где общее содержание мономера и сшивающего агента в исходном составе композиции лежит в интервале 3-40% ($3 < T < 40$), а соотношение мономера и сшивающего агента находится в пределах 97:3-60:40% ($3 < C < 40$).
6. Способ по п.3, где $0.0001\% \leq c \leq 10\%$.
7. Способ по п.4, где $0\% \leq d \leq 90\%$.
8. Способ по п.1, где $5\% \leq e \leq 95\%$.
9. Способ по п.1, где полимерный гидрогель получают сополимеризацией смесей из сочетаний акриламида, метакриламида, N-{трис(гидроксиметил)-метил}акриламид, N,N'-метиленбисакриламида, N,N'-1,2-дигидроксиэтилбисакриламида, полиэтиленгликольдиакриамида или других водорастворимых непердельных соединений.
10. Способ по п.1, где различные сочетания компонентов композиций позволяют получать гидрогели, с заданной величиной пор и повышенной термической устойчивостью.
11. Способ по п.3, где модифицированные олигонуклеотиды имеют

следующее строение:



I

где:

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$ - H, алкил $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, $\text{PhCH}_2\text{-}$;

Z - $(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2\text{OX}$, где $n=1\text{-}6$; или $(\text{CH}_2)_n\text{-OX}$, где $n=2\text{-}6$;

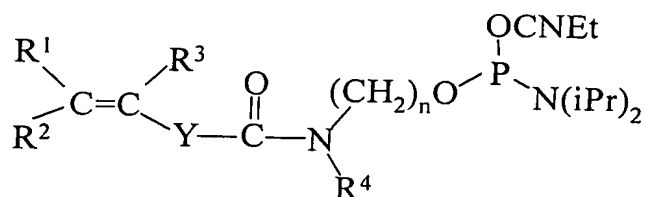
X - Фосфодиэфирная группа, связывающая неперделыйный фрагмент с 5'-и/или 3'-концом олигонуклеотида.

R^4 - H, $(\text{CH}_2)_n\text{OH}$, где $n=2\text{-}6$;

Y - $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$, где $n=0\text{-}2$;

12. Способ по п.11, где модификацию олигонуклеотидов неперделыйными группами осуществляют в автоматическом режиме.

13. Способ по п.12, где модификацию олигонуклеотидов неперделыйными группами осуществляют с помощью фосфоамидита общей формулы (II).



II

где:

R^1, R^2 - H, алкил $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, $\text{PhCH}_2\text{-}$, где $n=2\text{-}6$;

R^3 - алкил $\text{C}_1\text{-C}_6$;

R^4 - $H, (CH_2)_n\text{-ОДМТ}$, где $n=2-6$;

Y - $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$ где $n=0-2$;

14. Способ по п. 11, где модификацию олигонуклеотидов непредельными группами осуществляют в поставтоматическом режиме.

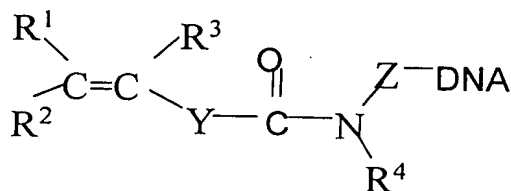
15. Способ по п. 14, где модификацию олигонуклеотидов непредельными группами осуществляют путем ацилирования олигонуклеотида, содержащего аминотинк, активированным эфиром непредельной кислоты.

16. Способ по п. 15, где активированный эфир непредельной кислоты представляет собой нитрофениловый эфир.

17. Способ по п. 12 и 14, где модификацию олигонуклеотидов непредельными группами осуществляют по 5'-концу олигонуклеотида.

18. Способ по п. 12 и 14, где модификацию олигонуклеотидов непредельными группами осуществляют по 3'-концу олигонуклеотида.

19. Способ по п.3, где модифицированные фрагменты ДНК выбирают из формул IV, V, VI.



IV

где:

R^1, R^2, R^3 - H , алкил $C_1\text{-C}_6$, Ph , $PhCH_2$ - ;

Z - $(CH_2)_nCH(CH_2OH)CH_2OX$, где $n=1-6$; или $(CH_2)_n\text{-OX}$, где $n=2-6$;

X - Фосфодиэфирная группа, связывающая неопределенный фрагмент с 5'-и/или 3'-концом олигонуклеотида.

R^4 - H, $(CH_2)_nOH$, где $n = 2-6$;

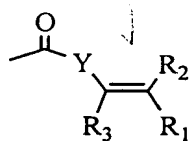
Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n = 0-2$;

или

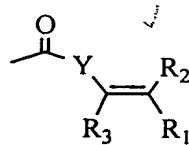


V

X = PO_3H_2 , H;



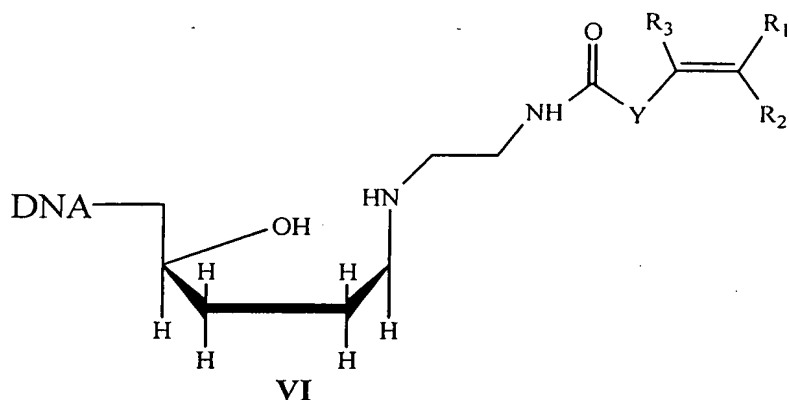
Z = PO_3H_2 , H;



R^1, R^2, R^3 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n = 0-2$;

или



где:

R^1, R^2, R^3 – H, алкил C_1 - C_6 , Ph, $PhCH_2$ - ;

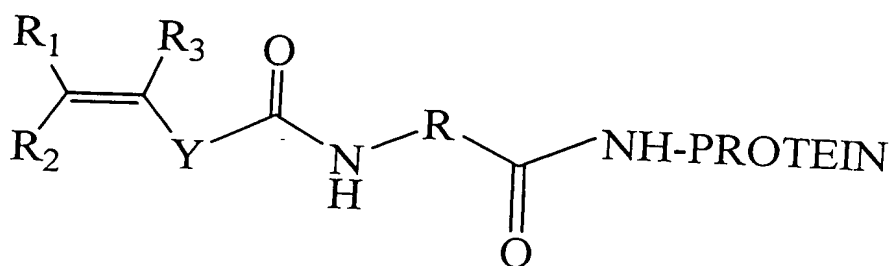
Y – $(p-C_6H_4)_n$, где $n = 0-2$;

20. Способ по п.19, где модифицированные фрагменты ДНК с формулой (IV) получают с использованием в PCR амплификации синтетического праймера, несущего на 5'-(3')- конце терминальную ненасыщенную группу.

21. Способ по п.19, где модифицированные фрагменты ДНК с формулой (V) получают прямым ацилированием фрагментов ДНК ангидридами непредельных кислот.

22. Способ по п.19, где модифицированные фрагменты ДНК с формулой (VI) получают аминированием ДНК с последующим ацилированием активированными эфирами ненасыщенных кислот.

23. Способ по п.3, где модифицированные белки выбирают из формул VIII, X, XI



VIII

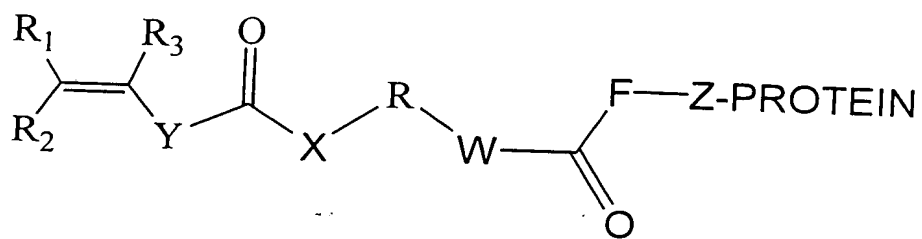
где:

R^1, R^2, R^3 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2$ - ;

Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n = 0-2$;

R - $(CH_2)_n$, $(CH_2O)_n$, $n = 1-20$

или



X

где

R^1, R^2, R^3 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2$ - ;

$Y - (p-C_6H_4)_n$, где $n = 0-2$;

$R - (CH_2)_n, (CH_2O)_n, n = 1-20$;

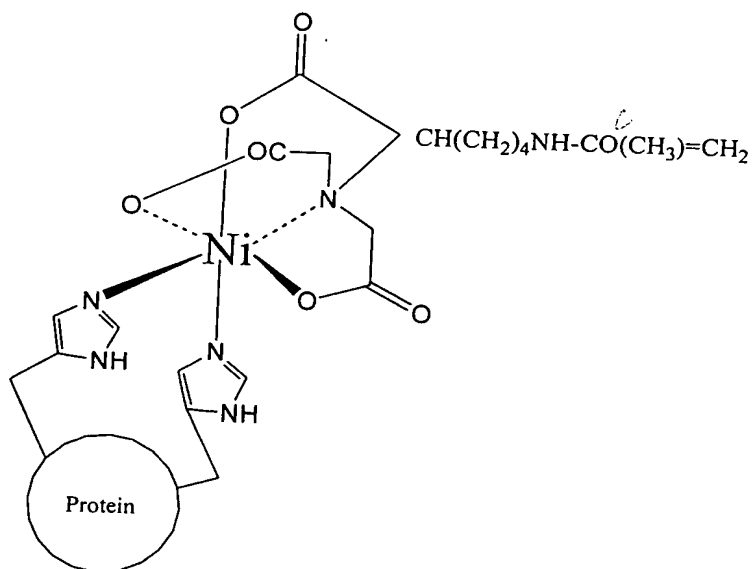
$X = NH, O$;

$W = NH, O, CH_2$.

$Z = NH, S$;

$F = (CH_2)_n, n = 1, 2$

или



XI

24. Способ по п.23, где модифицированные белки с формулой (VIII) получают ацилированием аминогрупп активированными эфирами соответствующих непредельных кислот.

25. Способ по п.24, где активированные эфиры имеют следующее строение:

где:

Y - (p-C₆H₄)_n, где n= 0-2;

$$\text{R}-(\text{CH}_2)_n, (\text{CH}_2\text{O})_n, n=1-20$$

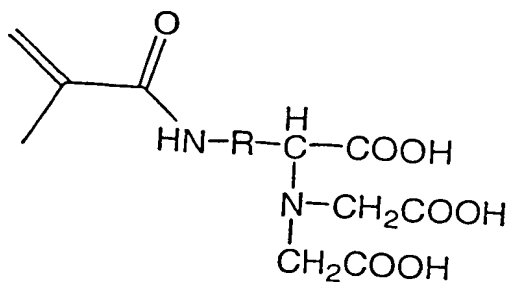
X- N-гидроксисукцинимидил, р-нитрофенилокси, пентафторфенилокси или любая другая акцепторная хорошо уходящая группа.

$$\text{Z-NH, O,CH}_2\text{,S}$$

26. Способ по п.23, где модифицированные белки формула (X) получают алкилированием сульфгидрильной или аминогруппы производными α,β -непредельных карбонильных соединений, α,β -непредельных и α -галоген карбоновых кислот.

27. Способ по п.23, где модифицированные белки формулы (XI) получают обработкой рекомбинантного белка с His6 N-метакрилоилнитротриуксусной кислотой в присутствии солей двухвалентного никеля.

28. Способ по п.27, где N-метакрилоилнитрилотриуксусная кислота имеет следующее строение:

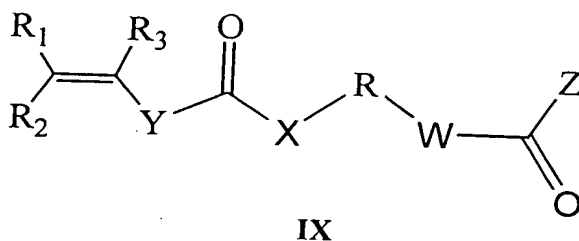


XII

где

$R = (CH_2)_n, (CH_2CH_2O)_n, n=0-20.$

29. Способ по п.26, где α, β -непредельные карбонильные соединения имеют следующее строение:



где

R^1, R^2, R^3 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n=0-2$;

R- $(CH_2)_n, (CH_2O)_n, n=1-20$;

X=NH, O, S, CH_2 ;

W=NH, O, CH_2 .

Z= галогенметил, этенил, сукцинимидил или любой другой фрагмент, содержащий активную кратную связь.

30. Способ по п. 1, в котором сформированный на подложке слой геля разделен пустыми промежутками на несколько ячеек, причем каждая из ячеек может содержать либо не содержать иммобилизованные макромолекулы, а макромолекулы иммобилизованные в разных ячейках могут различаться по своей природе и свойствам.

31. Способ по п.30, в котором указанные ячейки образуют регулярную одномерную или двумерную структуру (массив).
32. Способ по п.30, в котором нанесение полимеризационной смеси на подложку осуществляется при помощи автоматического устройства (робота), снабженного одним или несколькими микродиспенсерами.
33. Способ по п.32, в котором используются микродиспенсеры стержневого типа.
34. Способ по п.32, в котором используются бесконтактные микродиспенсеры струйного типа.
35. Способ по п.32, в котором используются несколько микродиспенсеров, образующих регулярную структуру.
36. Способ по п.30, в котором одна или несколько подложек с нанесенными на них каплями полимеризационной смеси перед полимеризацией выдерживаются в герметичном контейнере, содержащем аналогичную полимеризационную смесь в количестве, превышающем суммарное количество полимеризационной смеси, нанесенной на подложки, более чем в 2 раза.
37. Способ по п.30, в котором одна или несколько подложек с нанесенными на них каплями полимеризационной смеси перед полимеризацией и в процессе нее размещаются в герметичном контейнере в бескислородной инертной атмосфере с контролируемой влажностью.
38. Способ по п.37, в котором контейнер заполняется одним из следующих газов: N_2 , Ar, CO_2 .
39. Способ по п.36, в котором газовая среда в контейнере с подложками непрерывно или периодически обновляется.
40. Композиции для иммобилизации биологических макромолекул:

олигонуклеотидов, протеинов, ДНК(РНК) или любых других молекул, несущих ненасыщенные группы, следующего состава:

$$A^a + B^b + C^c + D^d + E^e = K$$

где А- акриламид (АА), метакриламид (МАА), N-трис(гидроксиметил)метил}-акриламид (ТА), или любой другой мономер на основе производных акриловой и метакриловой кислот;

В- N,N'-метиленабисакриламид (Bis), N,N'-1,2 дигидрокси-этилбисакриламид (DHEBA), полиэтиленгликольдиакриламид (PEGDA), их смесь или любой другой водорастворимый сшивающий агент;

С- модифицированный олигонуклеотид, модифицированная нуклеиновая кислота, протеин или другая молекула, несущая ненасыщенную группу;

Д- глицерин, поливиниловый спирт, сахароза или другое водорастворимое высококипящее соединение;

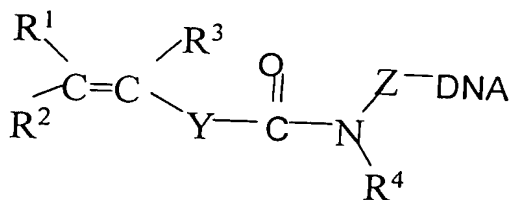
Е- вода;

К- композиция.

a,b,c,d,e-процентное содержание (X) каждого компонента в исходном составе композиции ($X = m/v \times 100\%$, для твердых веществ, или $X = v/v \times 100\%$ для жидких веществ).

$$3\% \leq a+b \leq 40\%; 0.0001\% \leq c \leq 10\%; 0\% \leq d \leq 90\%; 5\% \leq e \leq 95\%.$$

41) Модифицированные олигонуклеотиды следующего строения:



I

где:

R^1, R^2, R^3 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

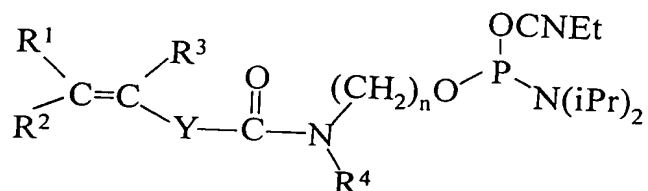
Z - $(CH_2)_nCH(CH_2OH)CH_2OX$, где $n=1-6$; или $(CH_2)_n-OX$, где $n=2-6$;

X - Фосфодиэфирная группа, связывающая неопределённый фрагмент с 5'- и/или 3'-концом олигонуклеотида.

R^4 - H, $(CH_2)_nOH$, где $n=2-6$;

Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n=0-2$;

42. Фосфоамидиты общей формулы



II

где:

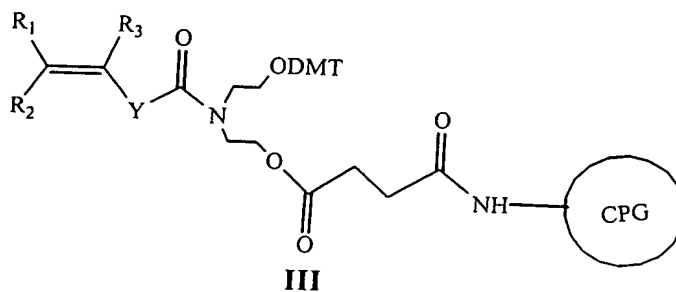
R^1, R^2 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$, где $n=2-6$;

R^3 - алкил C_1-C_6 ;

R^4 - H, $(CH_2)_n-ODMT$, где $n=2-6$;

Y - $(p-C_6H_4)_n$ где $n=0-2$;

43. СРГ следующего строения:



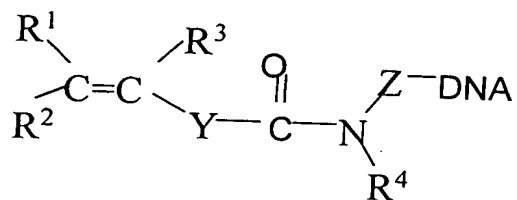
где:

R^1, R^2 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

R^3 - алкил C_1-C_6 ;

Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n = 0-2$;

44. Модифицированные фрагменты ДНК следующего строения:



где:

R^1, R^2, R^3 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Z - $(CH_2)_nCH(CH_2OH)CH_2OX$, где $n = 1-6$; или $(CH_2)_n-OX$, где $n = 2-6$;

X - Фосфодиэфирная группа, связывающая неопределенный фрагмент с 5'- и/или 3'-концом олигонуклеотида.

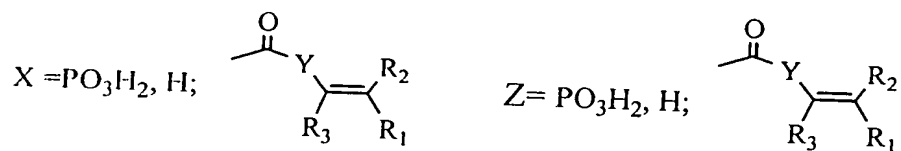
R^4 - H, $(CH_2)_nOH$, где $n=2-6$;

Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n=0-2$;

или



V

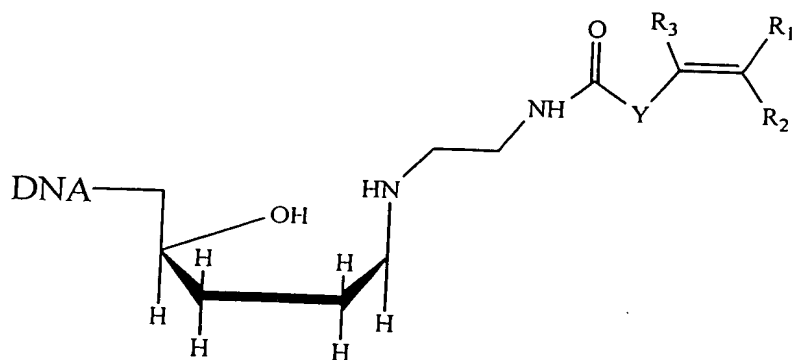


R^1, R^2, R^3 - H, алкил C_1-C_6 ,

Ph, $PhCH_2-$;

Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n=0-2$;

или



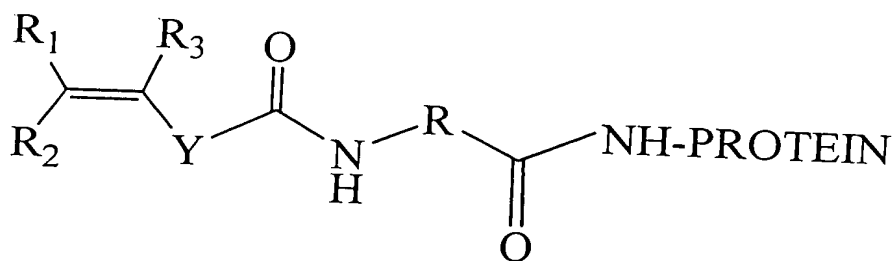
VI

где:

R^1, R^2, R^3 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n=0-2$;

45. Модифицированные белки следующего строения:



VIII

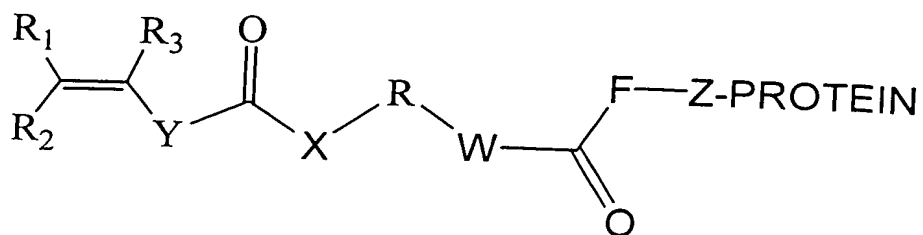
где:

R^1, R^2, R^3 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n=0-2$;

R- $(CH_2)_n$, $(CH_2O)_n$, $n=1-20$

или



X

где

R^1, R^2, R^3 - H, алкил C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y - $(p-C_6H_4)_n$, где $n=0-2$;

R- $(CH_2)_n$, $(CH_2O)_n$, $n=1-20$;

X=NH, O;

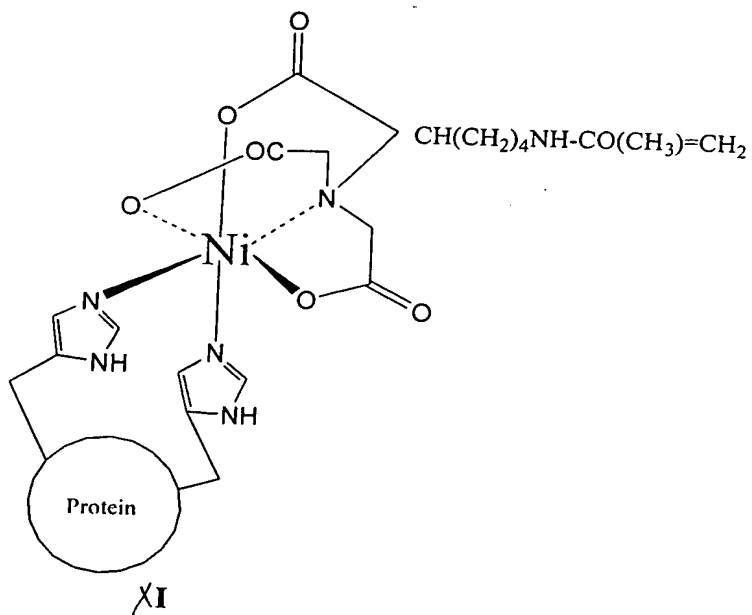
W= NH, O, CH_2 .

Z=NH, S;

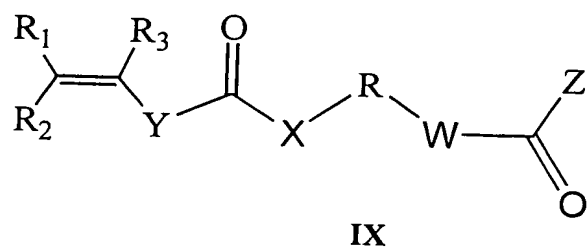
F= $(CH_2)_n$, $n=1,2$

или

51



46. α,β -Непредельные карбонильные соединения следующего строения:



где

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$ - H, алкил $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, PhCH_2 - ;

Y - $(\text{p-C}_6\text{H}_4)_n$, где $n=0-2$;

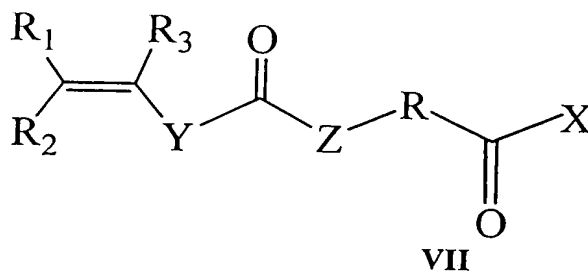
R- $(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2\text{O})_n$, $n=1-20$;

$X = \text{NH}, \text{O}, \text{S}, \text{CH}_2$;

$W = \text{NH}, \text{O}, \text{CH}_2$.

Z = галогенметил, этенил, сукцинимидил или любой другой фрагмент, содержащий активную кратную связь.

47. Активированные эфиры следующего строения:



где:

R^1, R^2, R^3 - H, алкил $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, PhCH_2 - ;

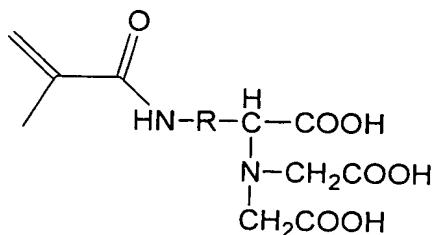
Y - $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$, где $n = 0\text{-}2$;

R - $(\text{CH}_2)_n, (\text{CH}_2\text{O})_n, n = 1\text{-}20$

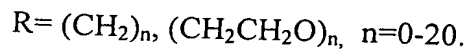
X - N-гидроксисукцинимидил, p-нитрофенилокси, пентафторфенилокси или любая другая акцепторная хорошо уходящая группа.

$Z = \text{NH}, \text{O}, \text{CH}_2, \text{S}$

48. N-Метакрилоилнитрилотриуксусная кислота следующего строения:



где



49. Способ проведения ПЦР-амплификации специфических фрагментов ДНК, в котором амплификация происходит как над, так и внутри, множества гелевых ячеек микрочипа, полученного методом кополимеризации, включающий следующие этапы:

- (а) приготовление микрочипа со специфическими наборами олигонуклеотидов (праймеров), иммобилизованными методом кополимеризации в определённых адресах (трёхмерных изолированных гелевых ячейках) чипа;
- (б) добавление раствора, состоящего из амплификационного буфера, праймеров и исследуемых образцов нуклеиновых кислот;
- (в) проведение ПЦР-амплификации путём циклических изменений температуры, в результате чего образуется множество амплификационных продуктов и идёт аллелеспецифическое удлинение иммобилизованных праймеров.

50. Способ проведения ПЦР-амплификации специфических фрагментов ДНК, в котором амплификация происходит внутри множества окружённых гидрофобной жидкостью гелевых ячеек микрочипа, полученного методом кополимеризации, включающий следующие этапы:

- (а) приготовление чипа со специфическими наборами праймеров, иммобилизованных методом кополимеризации внутри каждой

- из гелевых ячеек;
- (б) добавление раствора, содержащего исследуемые нуклеиновые кислоты и проведение гибридизации этих нуклеиновых кислот с праймерами, иммобилизованными внутри гелевых ячеек;
 - (в) замещение гибридизационного раствора амплификационным раствором;
 - (г) замещение водного амплификационного раствора гидрофобной жидкостью (минеральным маслом), которая полностью изолирует ячейки чипа друг от друга и окружает каждую из них;
 - (д) проведение ПЦР-амплификации внутри каждой гелевой ячейки путём циклических изменений температуры.

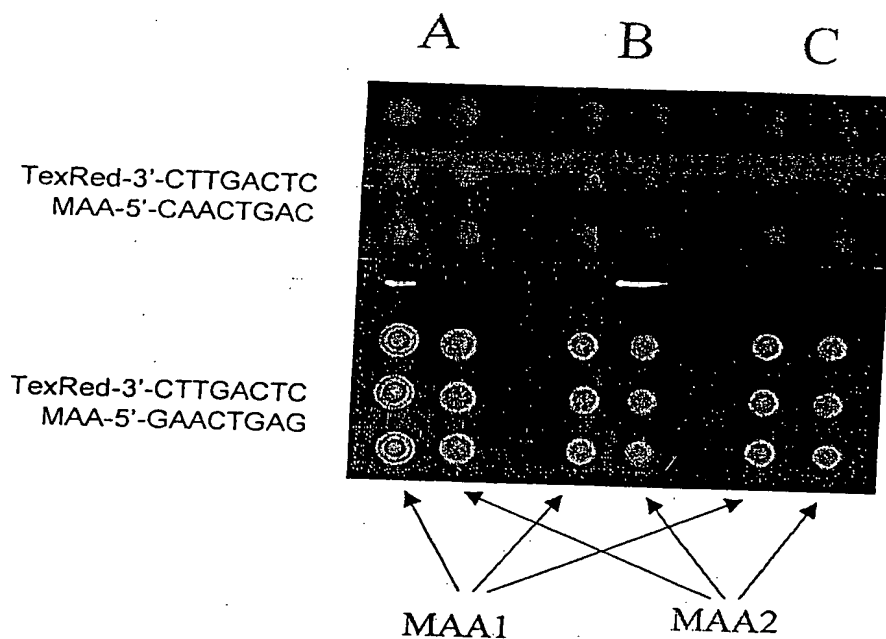


Рис.1

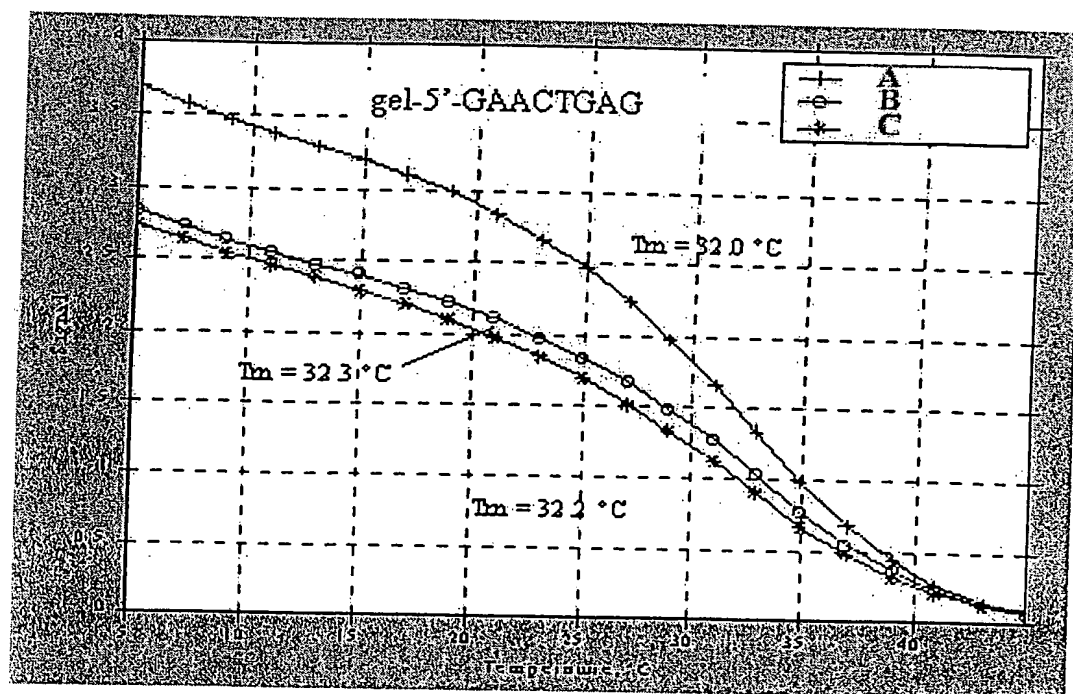


Рис.2

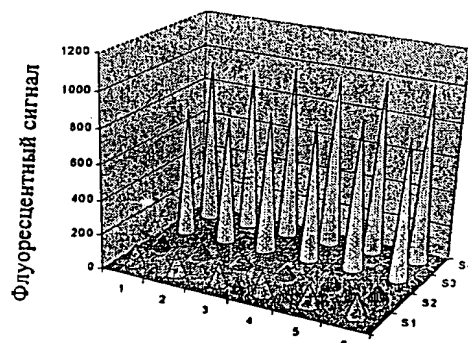
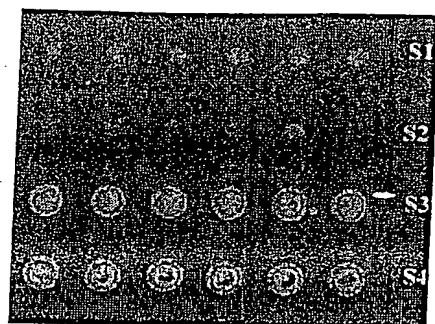


РИС.3

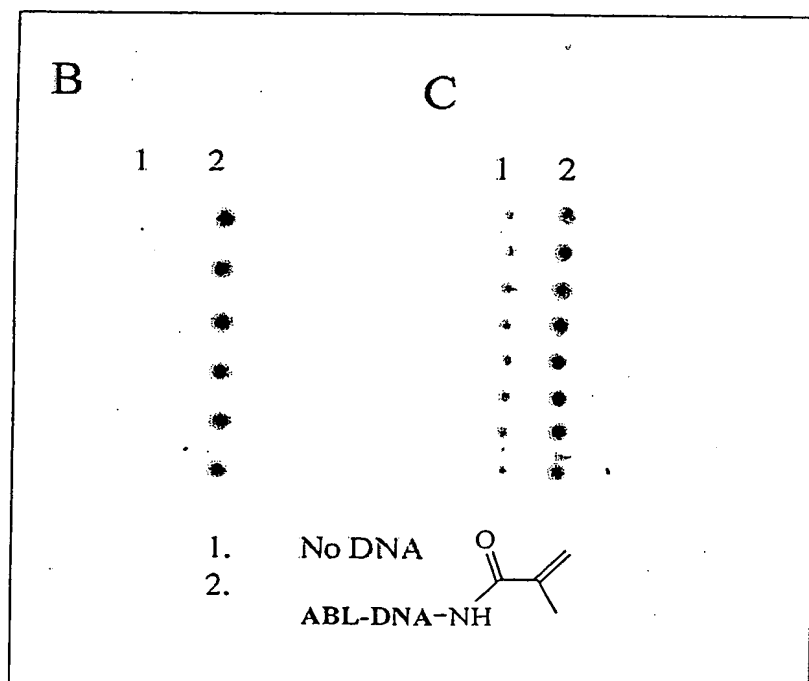
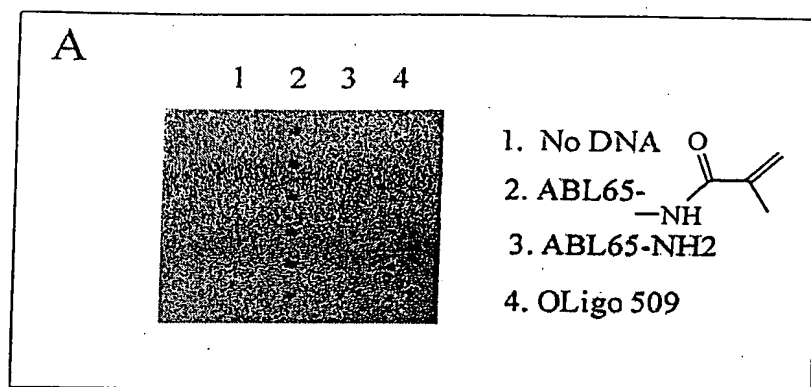


РИС.4

Дикий тип

Trp531

Asp526

531
526

531
526



РИС.5

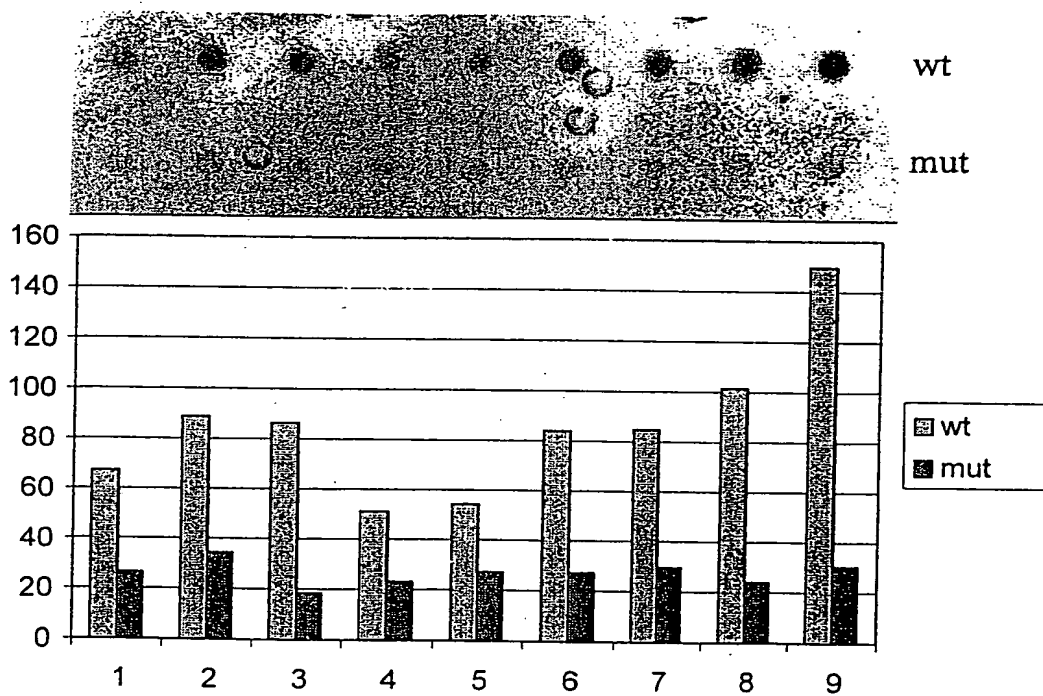


РИС.6

РЕФЕРАТ

Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии и биоорганической химии и касается композиций для иммобилизации модифицированных олигонуклеотидов, белков, нуклеиновых кислот или любых других молекул, несущих ненасыщенные группы, в гидрогеле при изготовлении микрочипов методом фотоиндуцируемой сополимеризации. Изобретение также относится к технологии изготовления микрочипов и проведению полимеразной цепной реакции (ПЦР) на чипе, находящих применение в молекулярной биологии при секвенировании и картировании ДНК, детектировании мутаций и целого ряда медицинских приложений.

По доверенности

RUSSIAN AGENCY FOR PATENTS AND TRADEMARKS

FEDERAL INSTITUTE OF INDUSTRIAL PROPERTY (FIPS)

Registration No. 20/12-155

March 16, 2004

C E R T I F I C A T E

Federal Institute of Industrial Property of the Russian Agency for Patents and Trademarks certify hereby that the documents appended herewith represent a facsimile reproduction of the original complete specification, claims and drawings (if any) of the Patent Application No. 2001120905 filed on the 25th day of the month of **July** in the year **2001 (25.07.2001)**.

Title of the Invention: **A METHOD FOR PRODUCTION AND A COMPOSITION FOR
IMMOBILIZATION OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES
IN HYDROGELS, AND APPLICATION THEREOF FOR
MANUFACTURING BIOCHIPS**

Applicant: **INSTITUT MOLECULYARNOI BIOLOGII
IM.V.A.ENGELGARDTA ROSSIISKOI AKADEMII NAUK**

Actual Authors: **MIRZABECOV Andrei Darievich
RUBINA Alla Jurievna
PANKOV Sergei Vasilievich
PEROV Alexandr Nikolaevich
CHUPEEVA Valentina Vladimirovna**

On behalf of the Agency: **A.L.ZHURAVLEV
Department Manager**

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

A method for production and a composition for immobilization of biological macromolecules in hydrogels, and application thereof for manufacturing biochips

Field of Invention

5 The invention refers to the field of molecular biology and bioorganic chemistry and deals with compositions for in hydrogel immobilization of modified oligonucleotides, proteins, nucleic acids, or any other molecules bearing unsaturated groups in preparing microchips by method of photo-initiated copolymerization. The invention also refers to the technology for manufacturing microchips and to performing a polymerase chain reaction
10 (PCR) over a chip having an application in molecular biology for sequencing and mapping of DNA, detection of mutations, and in a whole lot of medical applications.

Background of Invention

There are known in the art publications on immobilization of modified oligonucleotides and
15 proteins in an acrylamide gel in manufacturing biochips by method of copolymerization [1, 2].

[1] F. N. Rehman, M. Audeh, E. S. Abrams, P. W. Hammond, M. Kenney, and T. C. Boles, *Nucleic Acids Research*, 1999, V.27, № 15, P. 649-655.

[2] A. V. Vasiliskov, E. N. Timofeev, S. A. Surzhikov, A. L. Drobyshev, V. V. Shick ,
20 and A. D. Mirzabekov, *BioTechniques*, 1999, V.27, P. 592-606.

Conventionally, the compositions being used in publications cited for manufacturing the oligonucleotide and protein microchips may be subdivided into the following components:

- *Monomers making the basis of the gel being formed*

25 Use is made of mixtures of acrylamide and *N,N'*-methylenbisacrylamide as a gel forming carrier having the total content T = 5%, C = 5% (19 : 1) [2], and T = 10%, C = 3.3% (29 : 1) [1].

- *Modified oligonucleotides and proteins bearing the unsaturated groups*

30 There are proposed methods for synthesis of modified oligonucleotides and proteins bearing methacrylamide [1], acrylamide [2], and allyl [2] groups.

- *Medium for performing the photo-initiated copolymerization*

Use is made of water-glycerol solutions with corresponding ratios 25:75 [1] and 60:40 [2] to form a hydrogel.

35 The technology for immobilizing biological macromolecules in hydrogels finds application in

practice, particularly in manufacturing biological microchips (biochips) (Khrapko et al., US Patent No. 5552270; Ershov et al., US Patent No. 5770721). Presently, the biochips are considered as one of the most challenging analytical tools in the fields such as an investigation of DNA structure in molecular biology, a gene clinical diagnosis, monitoring pathogenic microorganisms etc. In these chips, the macromolecules playing a part of molecular probes are immobilized in hydrogel cells, which are fixed on a common support and form the regular structure (matrix).

There are known methods for manufacturing biochips based on hydrogels, in which a technological cycle consists of steps: (1) preparation of support, (2) forming a matrix of gel cells on the support, (3) application of the solution of biological macromolecules onto cells in line with biochip scheme predetermined, (4) chemical treatment of cells with the purpose of immobilizing molecules of probes, (5) washing and drying of biochips obtained. To form matrix of gel cells, it is provided the method of laser ablation of a special light-absorbing layer located under the continuous gel layer having a geometry being complement with respect to the predetermined geometry of cells' body (Ershov et al., US Patent No. 5770721), as well as the method of photo-polymerization through a mask (Guschin et al., Manual manufacturing of Oligonucleotide, DNA, and Protein Microchips, Analytical Biochemistry, 1997, Vol. 250, No. 2, pp. 203 – 211).

The methods stated are technically complicated, and uses are made of procedures not ensuring the necessary uniformity and reproducibility of gel cell properties and are hardly automatized.

There are also known methods for manufacturing biochips based on a gel in which steps of forming the cells' body and immobilizing molecules of probe are combined together by using a technique of photo- or chemical initiated copolymerization [1, 2]. The essence of these methods consists in that use is made of polymerization mixtures, which comprise, along with monomer and cross-linking agent, immobilized macromolecules provided with the unsaturated group, which enables an incorporation of these molecules into a polymer net of hydrogel.

According to a protocol for manufacturing biochips as disclosed in reference [1], chip cells are obtained by polymerization of the mixture droplets supported on a support using a micropipette.

For manufacturing a chip, in reference [2], use is made of a special thin-layer ($\approx 5 \mu\text{m}$) chamber having a reaction volume bounded, on the one hand, with a support of future chip and, on the other hand, with a window transparent for UV radiation. The biochip cells have been developed one after another by performing a cycle of the following operations: (1) filling a chamber with the mixture having a corresponding probe, (2) polymerization of the mixture by exposure of UV-beam focused into a square blemish of the necessary size in the location of future cell, (3) washing the chamber before its filling with the next solution.

It is clear that versions of copolymerization technology considered are also of little use for automatic manufacturing biochips. As to immobilization chemistry, the methods also have several drawbacks:

1. In manufacturing the gels, the application of acrylamide and *N,N'*-methylenebisacrylamide only restricts greatly the range of hydrogels obtained by their structure and porosity.

2. Preparation of modified oligonucleotides by method of authors [1] allows obtaining the 5'-end methacrylamide group only linked to the oligonucleotide molecule through a phosphamide linkage being labile in acids [3-5]:

[3] N.N. Preobrazhenskaya, Russ. Chem. Rev., 1972, 41, P.54.

[4] Chanley J., Feageson E., J.Am.Chem.Soc., 1965, 87, P.3199

[5] Clark V., Kirby G., J.Chem.Soc., 1957, P.1497.

3. The problem of lability in acids has been overcome in [2], however, the allyl terminal group, as inserted in the oligonucleotide molecule according to this method, has a low affinity to acrylamide and bisacrylamide in a copolymerization reaction.

4. The immobilization of proteins is provided by two-stage modification method [2] enabling an insertion of the unsaturated moiety by NH_2 -groups only.

For performing chemical polymerization of microchip elements by reference [1], it is proposed a damp nitrogen atmosphere that decreases the efficiency of polymerization.

For performing photo-initiated polymerization by reference [2], use is made of UV radiation with the wavelength of 254 nm that results in destruction of oligonucleotides [6].

[6] Saito I. et al. Tetrahedron Lett., 1981, 22, P. 3265-3268.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

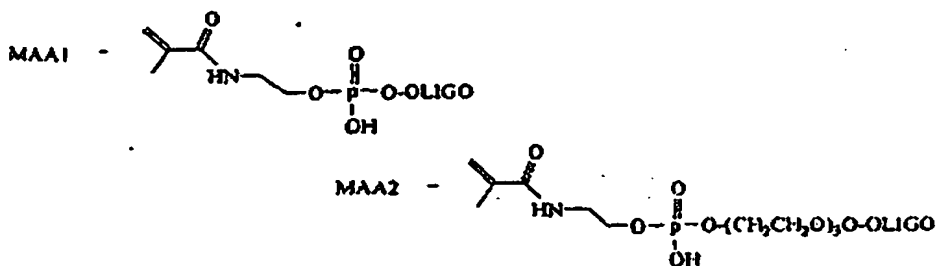
Fig. 1. Immobilization of oligonucleotides having a 5'-terminal unsaturated group onto a modified glass.

5 Compositions

A acrylamide, *N,N'*-methylenebisacrylamide-T10%, C5%; glycerol- 64,5%

B acrylamide, *N,N'*-methylenebisacrylamide-T5%, C5%; glycerol- 64,5%

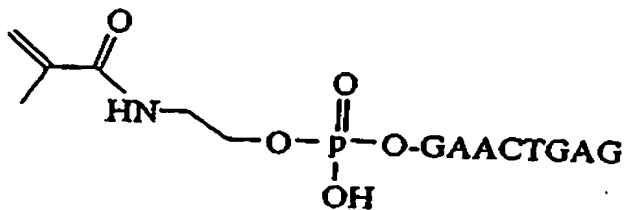
C (acrylamide + *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]acrylamide (1:3)): (*N,N'*-methylenebisacrylamide + (*N,N'*-(1,2-dihydroxyethyleneacrylamide) (3:7), T5%, C25%;
10 glycerol- 64,5%
comprising oligonucleotides



15 having a 5'-methacrylamide terminal group ($C=130 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) are polymerized by an exposure of UV-radiation on a modified glass. Oligonucleotides immobilized are hybridized with the fluorescently labeled oligonucleotide test ($1 \mu\text{M}$, 1M NaCl). A fluorescent pattern is obtained by using a fluorescent microscope.

Fig. 2. Thermodynamic analysis of 8-dimensional duplexes.

20 Immobilized oligonucleotides ($C=130 \text{ pmol}/\mu\text{l}$):



hybridized fluorescently labeled oligonucleotide: 5'-CTCAGNNC-Texas Red (1 μ M, 1M NaCl). Compositions

A acrylamide, *N,N'*-methylenebisacrylamide-T10%, C5%; glycerol- 64,5%

B acrylamide, *N,N'*-methylenebisacrylamide-T5%, C5%; glycerol- 64,5%

5 C (acrylamide + *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]acrylamide (1:3)): (*N,N'*-methylenebisacrylamide + (*N,N'*-(1,2-dihydroxyethyleneacrylamide) (3:7), T5%, C25%; glycerol- 64,5% comprising oligonucleotides

Fig. 3. Protein immobilization in a hydrogel via modified amino-groups

10 The modified Barnase protein having from 1 to 9 unsaturated groups inserted per one protein molecule is immobilized by method of photo-initiated copolymerization under an exposure of UV-radiation (312 nm) over a glass modified with Bind Silane. Protein concentration in gel elements of microchip is of 0.09 mg/mL. The composition of polymerization mixture is as follows: T5%, C25%; (acrylamide + *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]acrylamide (1:3)): (*N,N'*-methylenebisacrylamide + (*N,N'*-(1,2-dihydroxyethyleneacrylamide) (3:7), glycerol- 64,5%.

A binding with a fluorescently labeled Barstar inhibitor is performed in a brine (0.1M NaCl) phosphate buffer (0.01M, pH 7.4) comprising 0.1% Tween 20, for 8 h, at 5°C; Barstar concentration is of 0.1 mg/mL. The effect of number of groups inserted on the immobilized protein activity is evaluated by a signal intensity obtained by using a fluorescent microscope.

20 S1 – protein free gel

S2 – totally modified protein (9 groups)

S3 – 5 groups, S4 – 1 group.

25 **Fig. 4.** Immobilization of DNA fragments in an acrylamide gel (acrylamide- *N,N'*-methylenebisacrylamide-T5%, C5%) bearing a terminal unsaturated group.

A. Hybridization of oligonucleotides immobilized

ABL65 5'-CAGT CTGG AGAAA CACT CCTGG TAC-3',

bearing or not bearing a terminal group MAA and non-specific oligonucleotide *oligo* 509 having a probe labeled with FITC (*probe ABL67*). Oligonucleotide *ABL67* is complementary to oligonucleotide *ABL65*.

B. Human gene fragment ABL staining with SYBR II GREEN

immobilized over a glass (*ABL DNA*). The DNA fragment is prepared by PCR amplification cDNA having specific primers to the gene *ABL*. The product having a size of 334 base pairs (233-566, beginning from a start of transcription) is treated with methacrylic acid anhydride

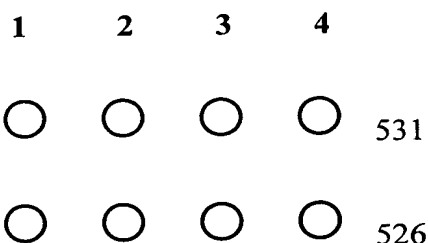
and immobilized over a glass. The staining is performed by procedure as recommended by the manufacturer.

C. Hybridization of the same fragment immobilized having a probe labeled with FITC (*probe 67*).

Fig. 5. Detection of mutations in 526 and 531 gene codons coding RNA-polymerase of *M. tuberculosis* by using the PCR over a microchip as obtained by copolymerization.

There are performed three independent experiments using the genomic DNA of *M. tuberculosis* of wild type or DNA comprising a known mutation (Trp531 or Asp526) as the objects of study.

Scheme of the chip



The structure of oligonucleotides immobilized over a microchip by copolymerization:

531 codon

- | | |
|----------|---------------------------------------|
| 1.leu531 | GGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTT |
| 2.cys531 | GGTTGACCCAtAAGCGCCGACTGTGT |
| 3.trp531 | GGTTGACC a ACAAGCGCCGACTGTGG |
| 4.ser531 | GGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTC (wild type) |

526 codon

- | | |
|----------|--|
| 1.Asn526 | CCAGAACAAC a CGCTGTCGGGGTTGACCA |
| 2.Tyr526 | CCAGAACAAC a CGCTGTCGGGGTTGACCT |
| 3.Asp526 | CCAGAACAACCCGCTGTCG t GGTTGACCG |
| 4.His | CCAGAACAACCCGCTGTCGG t GTTGACCC (wild type) |

The structure of oligonucleotide used in solution:

F (forward): 5'-NH₂-GGT-CGC-CGC-GAT-CAA-GGA-GT-3'

R (reverse): 5'-NH₂-CGG-CAC-GCT-CAC-GTG-ACA-GA-3'

Fig. 6. Illustration of allele specific elongation of immobilized primers as a result of PCR performed inside of biochip's gel cells under mineral oil.

As an object of study, use is made of genomic DNA of *M. tuberculosis* strain (wild type). A lower part of this figure represents the relative quantitative data on the fluorescent intensity (because of hybridization of the fluorescently labeled, asymmetric PCR-chain with the immobilized primer elongated due to PCR) in cells with the primer (wt) being entirely complementary to the DNA studied and in cells with the mutant primer (mut).

The structure of oligonucleotides immobilized over the microchip by method of copolymerization:

C4: CCAGAACAACCCGCTGTCGGTGTGACCC (wild type)

C5: CCAGAACAACaCGCTGTCGGGGTTGACCT (Tyr526)

Summary of the Invention

The essence of invention consists in that oligonucleotides, proteins, nucleic acids, or any other biological macromolecules are modified with various unsaturated groups having a high affinity with the unsaturated monomer being the basis of hydrogel formed (such as acrylamide, methacrylamide, or any other similar monomer) that allows performing the effective immobilization of modified oligonucleotides in a gel straight in the process of its preparation. In particular, this immobilization procedure forms the basis of method for preparing biological microchips based on hydrogels, which method is a constituent of the present invention.

According to the present method of immobilization of biological macromolecules in hydrogels, for preparing thereof, use is made of composition of the following formula:

$$K = A^a + B^b + C^c + D^d + E^e$$

wherein

K is a composition;

A is acrylamide, methacrylamide, *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]acrylamide, or another monomer based on derivatives of acrylic and methacrylic acids;

B is *N,N'*-methylenebisacrylamide, *N,N'*-1,2-dihydroxyethylenebisacrylamide, polyethyleneglycol diacrylate, a mixture thereof or other symmetric or asymmetric cross-linking water soluble agent based on derivatives of acrylic and methacrylic acids;

C is a modified oligonucleotide, modified nucleic acid, protein or another molecule

bearing unsaturated group;

D is glycerol, sucrose, *N,N*-dimethylformamide, dimethylsulfoxide, polyhydric alcohols (e.g., polyvinyl alcohol), or another water soluble high-boiling compound;

E is water;

5 **a,b,c,d,e** are percentages of any ingredient in the composition (for solids $X = m/v \times 100\%$ and for liquids $X = v/v \times 100\%$).

$3\% \leq a+b \leq 40\%$; $0.0001\% \leq c \leq 10\%$; $0\% \leq d \leq 90\%$; $5\% \leq e \leq 95\%$.

10 Along with gels of another application, the composition as indicated above is proposed to use for manufacturing oligonucleotide, protein, and DNA (RNA) microchips by method of photo-initiated copolymerization using the technology as follows.

The present composition for manufacturing biological oligonucleotide, protein, and DNA (RNA) chips will make use of the following ingredients:

15

- Monomers composing the basis of gel being formed

20 As gel-forming monomers, there are proposed various combinations of acrylamide, methacrylamide, *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]acrylamide, *N,N'*-methylene bisacrylamide, *N,N'*-1,2-dihydroxyethylene bisacrylamide, or any other water soluble monomer based on derivatives of acrylic and methacrylic acids. In this case the total content of monomer and cross-linking agent in the composition ranges from 3 to 40% ($3 < T < 40$), and the monomer to cross-linking agent ratio being in the range of 97:3-60:40% ($3 < C < 40$).

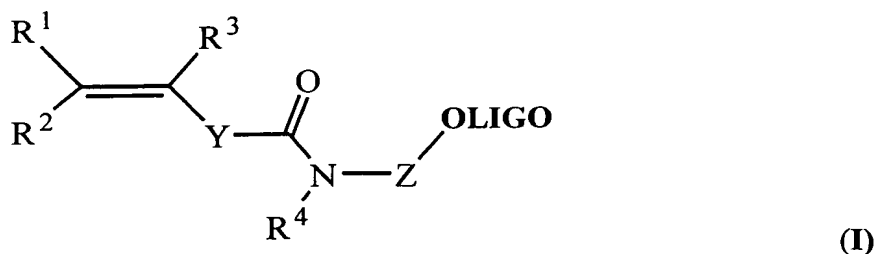
25 Hydrogels having a predetermined pore size are to be prepared by varying the combinations and ratios of monomers.

- Modified oligonucleotides, proteins, nucleic acids, which structures comprise fragments of unsaturated acids.

30

Methods of modification of oligonucleotides

For manufacturing oligonucleotide microchips there are provided synthetic oligonucleotides of general formula:



wherein

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$ are H, alkyl $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, $\text{PhCH}_2\text{-}$;

5 Z is $(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2\text{OX}$ where $n = 1\text{-}6$; or $(\text{CH}_2)_n\text{-OX}$ where $n = 2\text{-}6$;

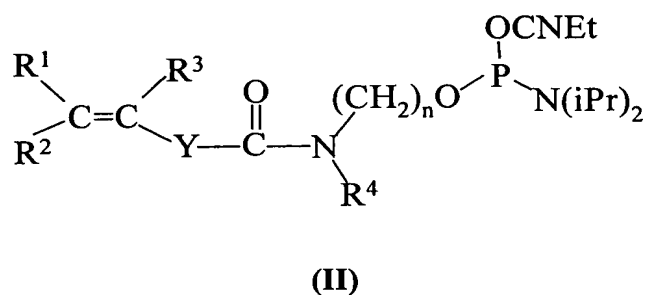
X is a phosphodiester group binding an unsaturated moiety to 5'- and/or 3'-end of the oligonucleotide;

R^4 represents H, $(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ where $n = 2\text{-}6$;

Y is $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$ where $n = 0\text{-}2$;

10 being prepared by using conventional phosphoramidite solid-phase synthesis or acylation of synthetic, amino-linker comprising oligonucleotide with activated esters of unsaturated acid in post-automatic conditions.

- In automatic conditions, the insertion of unsaturated compounds into synthetic oligonucleotide is performed by using the corresponding phosphoramidite. In the
15 general case of modifying oligonucleotides, there are provided phosphoramidites of formula:



20 wherein

R^1, R^2 are H, alkyl $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, $\text{PhCH}_2\text{-}$, where $n = 2\text{-}6$;

R^3 is alkyl $\text{C}_1\text{-C}_6$;

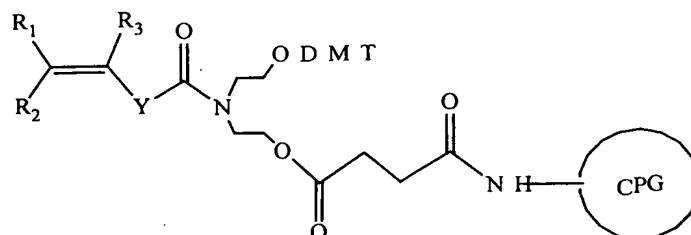
R^4 represents H, $(\text{CH}_2)_n\text{ODMT}$ where $n = 2\text{-}6$;

Y is $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$ where $n = 0\text{-}2$.

25

Example 1 represents a procedure for synthesis of 2-(N-methacrylaminoethyl)-N,N'-diisopropyl-2-cyanoethyl phosphoramidite.

For inserting unsaturated acid at 3'-end of oligonucleotides under conditions of automatic synthesis of oligonucleotides, there are provided a carrier porous glass (CPG) of the following structure:



III

wherein:

R^1, R^2 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

R^3 is alkyl C_1-C_6 ;

Y is $(p-C_6H_4)_n$, where $n = 0-2$,

Use is made of this modified glass (CPG) in conventional conditions of automatic synthesis of oligonucleotides.

Example 2 sets forth a procedure for synthesis of methacrylamide-CPG-support.

- In post-automatic conditions, the insertion of unsaturated fragment into oligonucleotide is performed by using reaction of 4-nitrophenyl ester of corresponding acid with the amino-linker comprising, synthetic oligonucleotide at 5'- and/or 3'-end. There are prepared 4-nitrophenyl esters of unsaturated acids by reaction of corresponding acids with 4-nitrophenol in the presence of dicyclohexyl carbodiimide or acid anhydrides (including chloranhydrides) in the presence of bases.

Example 3 represents the general acylation procedure for synthetic oligonucleotides having unsaturated groups.

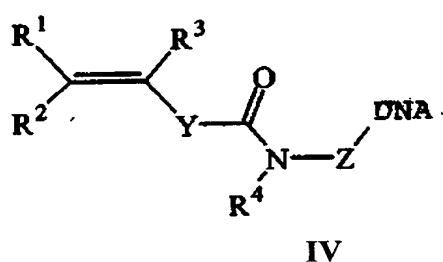
Fig. 1 represents results of hybridization over a oligonucleotide microchip wherein the oligonucleotide with 5'-terminal methacrylamide group is prepared under conventional conditions of automatic synthesis of oligonucleotides using phosphoramidites of formula (II).

Methods of modification of DNA

For manufacturing DNA microchips there are provided three methods for modifying DNA fragments to insert unsaturated group in the molecule structure:

- Utilization of synthetic primer bearing a terminal unsaturated group in PCR-amplification.

This method allows preparing a double-stranded or one-stranded DNA fragment of the following structure:



wherein:

R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Z is $(CH_2)_nCH(CH_2OH)CH_2OX$ where $n = 1-6$; or $-(CH_2)_n-OX$ where $n = 2-6$;

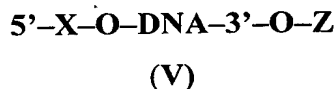
X is a phosphodiester group binding an unsaturated moiety to the end fragment of the DNA;

R^4 represents H, $(CH_2)_nOH$ where $n = 2-6$;

Y is $(p-C_6H_4)_n$ where $n = 0-2$;

- Direct acylation of DNA fragments with unsaturated acid anhydride.

Utilization of unsaturated acid anhydrides for acylation of DNA allows preparing modified DNA fragments of the following structure:



wherein

X is H, H_2PO_3 , $-CO-Y-CR^3=CR^2R^1$;

Z represents H, H_2PO_3 , $-CO-Y-CR^3=CR^2R^1$

R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y represents $(p-C_6H_4)_n$ where $n = 0-2$.

It is managed to perform the direct acylation of DNA fragments not affecting the exocyclic amino groups of bases [7].

[7] Stuart A., Khorana H.G., J. Biol. Chem., 1964, 239, P. 3885-3892.

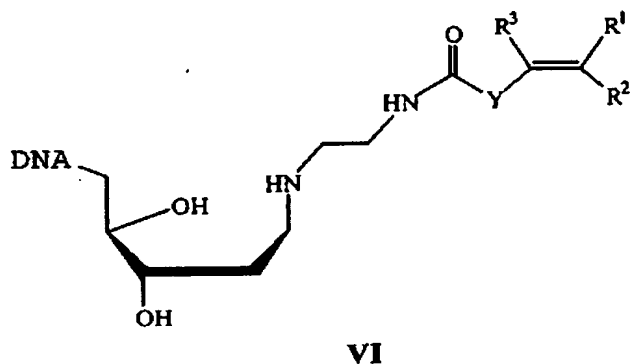
Example 4 sets forth a procedure for *O*-acylation of DNA fragments with anhydrides of unsaturated acids.

- Amination of DNA followed by acylation with activated esters of unsaturated acids.

The DNA fragment aminated by procedure [8] is acylated with activated esters of unsaturated acids in water organic medium.

[8] Proudnikov D, Timofeev E, Mirzabekov A., Anal Biochem. 1998, 15; 259(1), P. 34-41.

10 The modified DNA fragments obtained have of the following structure:



wherein:

- 15 R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;
 Y is $(p-C_6H_4)_n$ where $n = 0-2$.

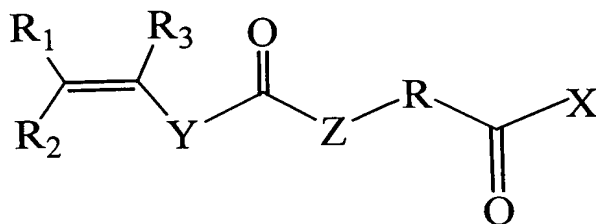
Example 5 sets forth a procedure for amination of DNA followed by acylation with activated esters of unsaturated acids.

20 Fig. 4 shows the results of hybridization over microchips with the immobilized DNA fragments.

Methods of modification of proteins

25 Modification of proteins is performed by three methods:

1. Acylation of proteins at amino groups is performed with activated esters of acids of the following structure:



VII

wherein:

R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

5 Y is $(p-C_6H_4)_n$, where $n = 0-2$;

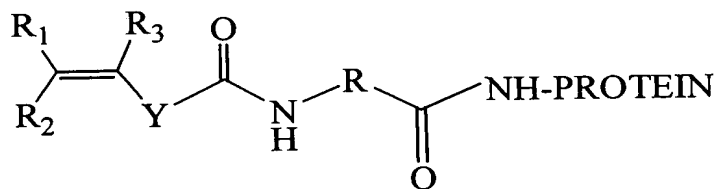
R is $(CH_2)_n, (CH_2CH_2O)_n$, where $n = 1-20$;

X is N-hydroxysuccinimidyl-, *p*-nitrophenyloxy-, pentafluoro phenyloxy-, or any other readily leaving acceptor group;

Z is NH, O, CH_2 , S.

10

Modified proteins have the following structure:



VIII

wherein

15 R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y is $(p-C_6H_4)_n$, where $n = 0-2$;

R is $(CH_2)_n, (CH_2CH_2O)_n$, $n = 1-20$;

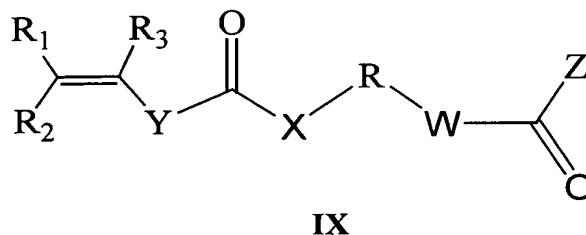
Z is NH, O, CH_2 , S.

20

Example 6 sets forth a procedure for modification of proteins at amino groups by example of Barnase protein.

Fig. 3 shows the results of hybridization over microchips with the immobilized Barnase protein.

2. Alkylation of protein's amino- or sulfhydryl groups with derivatives of α,β -unsaturated carbonyl compounds and α -halocarboxylic acids is performed by reagents of the following structure:



5 wherein

R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y is $(p-C_6H_4)_n$, where $n = 0-2$;

R is $(CH_2)_n, (CH_2CH_2O)_n, n = 1-20$;

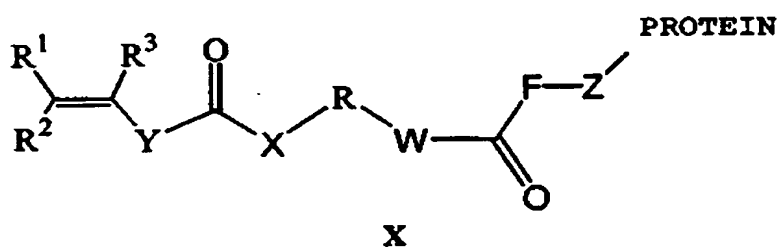
X is NH, O, S, CH_2 ;

10 W is NH, O, CH_2 ;

Z is a halomethyl, vinyl, succinimidyl, or any other fragment comprising an active multiple bond.

Modified proteins have the following structure:

15



wherein

20 R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y is $(p-C_6H_4)_n$, where $n = 0-2$;

R is $(CH_2)_n, (CH_2CH_2O)_n, n = 1-20$;

X is NH, O, S, CH_2 ;

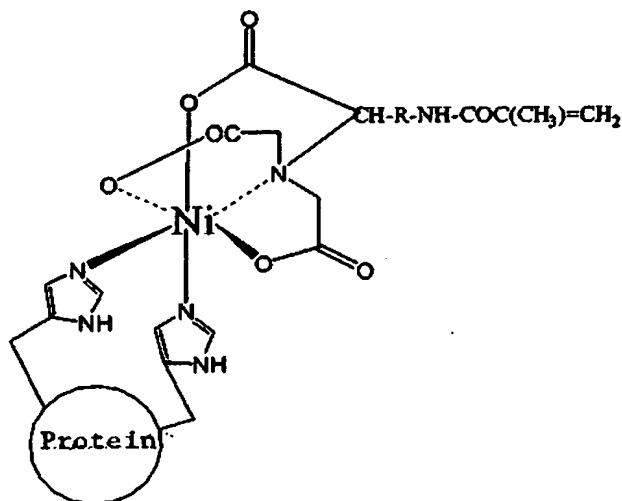
W is NH, O, CH_2 ;

25 F is $(CH_2)_n, n=1, 2$;

Z is NH, S.

Example 6 sets forth a procedure for alkylation of aspartate-aminotransferase from cytosol of hen's liver with 2-acryloyloxyethyl methacrylate.

3. A treatment of His-6 recombinant protein with N-methacryoyl nitrilotriacetic acid in the presence of nickel (Ni^{2+}) salts results in the formation of complex of the following structure:



XI

- 10 N-Methacryoyl nitrilotriacetic acid has the following structure:



XII

- 15 wherein R represents $(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, $n = 0-20$.

Fig. 4 represents results of hybridization over the protein microchip.

- Medium for performing a photo-initiated polymerization.

- 20 As a medium in forming a gel, there are provided water-glycerol solutions, water-polyvinyl alcohol solutions, water-sucrose solutions, solutions of *N,N*-dimethylformamide, dimethylsulfoxide and other water soluble high-boiling compounds. The content of water in gel-forming compositions ranges from 5% to 90% (v/v) and that of water soluble high-boiling compound ranges from 5% to 95% (m/v; v/v).

Depending on the water to high-boiling water soluble component ratio, there are obtained gel compositions of various viscosities that allow varying a size of gel elements of microchip under a pin robot diameter fixed.

- 5 • Monomer being covalently bonded to the glass surface

For modifying a glass surface with a purpose of covalent bonding chip elements to the surface, there are provided the following reagents: 3-trimethoxysilylpropyl methacrylate, 3-trimethoxysilylpropyl methacrylamide, 3-trimethoxysilylpropyl acrylamide, 3-glycidyloxypropyl trimethoxysilane.

10

Such a range of modification agents allows preparing chips which may be used under the broad ranges of pH (from 2 to 12) and temperatures from -10°C to $+100^{\circ}\text{C}$.

15

Various combinations of composition ingredients allow preparing microchips, which elements' porosity may change over a broad range that makes it possible to use these chips in many applications, particularly for performing a polymerase chain reaction (PCR), as well as to investigate an interaction in oligonucleotide-oligonucleotide, DNA-oligonucleotide, protein-protein, and protein-DNA systems.

20

Based on compositions proposed, the technology for manufacturing microchips by using photo-initiated polymerization comprises the following methods:

- (1) preparation of compositions and supports for manufacturing a microchip,
 (2) application of microchip elements,
 25 (3) leveling the water content in microchip elements,
 (4) initiating a polymerization,
 (5) washing a microchip obtained,
 (6) storing the compositions.

30

On preparation of compositions for manufacturing a chip, all components are carefully mixed to form a homogeneous solution, which is evacuated ($P = 12 \text{ mm Hg}$) and transferred into plates for micro titration that will be further used as a source of solutions on application onto support (supports) by using an automatic device (robot) which is equipped with one or more micro dispensers.

35

Method for manufacturing biochips is further disclosed in the case of using standard preparative glasses as supports. However, it is clear that this does not restrict the field of

application of proposed methods for immobilizing macromolecules and manufacturing biochips because of techniques as follows may be readily adapted to supports of another types, e.g. made of quartz, oxidized silicon, etc.

5 The preparation of glass to apply a composition for polymerization comprises a cleaning step by a sequential treatment of glass with a concentrated alkali, acid, and a step of chemical modification of glass by using solutions of 3-trimethoxysilylpropyl methacrylate, 3-trimethoxysilylpropyl methacrylamide, 3-trimethoxysilylpropyl acrylamide, and 3-glycidyloxypropyl trimethoxysilane in organic solvents.

10 In biochip, the structure of the cells' body is formed by application of the regular body of micro droplets of polymerization composition onto the support prepared. In the general case, any micro droplet comprises macromolecules of special type. Depending on the viscosity and other properties of the polymerization compositions, and on the desired size of biochip cells
15 as well, uses are made of robots having microdispensers of various types, for application. Particularly, in case of application of viscous solutions having the content of glycerol over 40%, uses are made of robot equipped with microdispensers of a rod (pin) type, such as robot "417 Arrayer" made in Affymetrix Co. (USA). In this case, depending on the rod diameter of dispenser, it is possible to obtain droplets (and consequently gel cells) of various size.

20 Because of sequential application of droplets on formation the body, a discrepancy of duration of their contact with ambient air results in the different composition of droplets to the completion time of the application, mainly due to adsorption/desorption processes of atmospheric water. This phenomenon results in heterogeneity of cells' size in the body
25 formed. For solving the problem, following the application, biochips are placed into the sealed container, which contains a polymerization mixture having the composition similar to the application mixture, but free of biological macromolecules. The volume of this mixture should exceed the aggregate volume of applied micro droplets at least two times. Usually, an incubation period of biochips in the container is at least 2 h. The biochips are further saturated
30 with dried inert gas (nitrogen, argon, carbon dioxide, etc.).

The polymerization process is initiated with UV-radiation ($\lambda \geq 312$ nm) in the inert gas atmosphere. The biochips obtained are washed in distilled water at 60°C for 5 h, and air-dried at 25°C.

35 The compositions prepared may be stored at temperature minus 21°C at least for 1 year.

Polymerase chain reaction (PCR) over a chip

A manufacturing oligonucleotide biochips is one of the most important application of the technology disclosed (immobilizing oligonucleotides in a gel by method of copolymerization). Uses are made of biochips prepared both in hybridization experiments and in performing more complex processes, such as polymerase chain reaction (PCR) over a chip. Following are set forth the demonstration examples of utilization of PCR over a chip (both in cases where PCR-solution covers gel cells of chip and where PCR proceeds only inside of gel cells being isolated each other and surrounded with a mineral oil).

Reaction PCR over a chip is also applied for a total characterization of copolymerized gel elements of chip having various compositions and for selection of the optimal method of their preparation. The main factors affecting an efficiency of PCR-analysis over the chip are a facile diffusion of DNA fragments measuring about 140 nucleotides (gel porosity), stability of cells over a broad range of pulsating temperatures, and availability and efficiency of participation of immobilized oligonucleotide in hybridization and allele specific polymerase reaction to elongate its chain.

Example 8 sets forth a procedure for carrying out the PCR over a chip.

Figs. 5, 6 illustrate the results of PCR-analysis over the chip.

The subject matter of invention is further disclosed by the specific Examples not to be construed as a restriction of the following claims.

Examples

Example 1. Synthesis of 2-(N-methacrylaminoethyl)-N,N'-diisopropyl-2-cyanoethyl phosphoramidite

Methacrylic acid 4-nitrophenyl ester. A solution of 1,3-dicyclohexyl carbodiimide (2.68 g, 12.98 mmole) in ethylacetate (7 mL) is added to the solution of methacrylic acid (1.015 g, 11.79 mmole) and 4-nitrophenol (1.804 g, 12.98 mmole) in ethylacetate (14 mL) at 0°C and the mixture is stirred for 15 h at room temperature. A suspension is filtered through a glass filter. The filtrate is evaporated in vacuum reducing a volume to 10 mL and cooled down to minus 50°C. The precipitate formed is readily filtered through a glass filter and dried in vacuum. Yield is of 2.12 g (87%), R_f = 0.86 (acetone/petroleum ether = 3:2), melting point (Mp) 94-95°C.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 2.10 (s, 3H, CH_3), 5.95 (s, 1H, $\text{CH}_2=$), 6.33 (s, 1H, $\text{CH}_2=$), 7.50 (apparent d, $J=9.0$ Hz, 2H, C_6H_4), 8.31 (apparent d, $J=9.15$ Hz, 2H, C_6H_4).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 18.85 (CH_3), 124.16, 126.20, 145.98, 156.43 (C_6H_4), 129.67, 135.72 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 165.51 ($-\text{COO}-$).

5 Calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_4$: C, 57.97; H, 4.35%;

Found: C, 57.99; H, 4.50%.

***N*-(2-Hydroxyethyl) methacrylamide.** A solution of ethanolamine (2.94 g, 48.30 mmole) in acetonitrile (40 mL) is added to the solution of methacrylic acid 4-nitrophenyl ester (5.00 g, 24.15 mmole) in acetonitrile (40 mL) at 0°C and the mixture is stirred for 15 h at room temperature. A suspension is filtered through a glass filter. The filtrate is evaporated in vacuum. The residuum is purified using silica column flash chromatography (acetone/petroleum ether = 3:2). Yield is of 2.804 g (90%), $R_f = 0.41$ (acetone: petroleum ether = 3:2), a straw oil.

15 ^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 1.85 (s, 3H, CH_3), 3.17 (apparent q, $J=5.92$ Hz, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2$), 3.42 (apparent q, $J=5.91$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 4.55 (t, $J=5.29$ Hz, 1H, OH), 5.26 (apparent s, 1H, $-\text{CH}=$), 5.65 (apparent s, 1H, $-\text{CH}=$), 7.75 (br s, 1H, $-\text{NH}-$).

20 ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 19.61 (CH_3), 42.74 ($-\text{NH}-\text{CH}_2$), 60.75 ($-\text{CH}_2\text{O}-$), 119.67, 140.85 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 168.34 ($-\text{COO}-$).

Calculated for $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$: C, 55.81; H, 8.53%;

Found: C, 55.87; H, 8.64%.

2-(*N*-methacrylaminoethyl)-*N,N'*-diisopropyl-2-cyanoethyl phosphoramidite

25 A solution of tetrazol (0.095 mmole) in acetonitrile (0.25 mL) is added to the solution of *N*-(2-hydroxyethyl) methacrylamide (0.1 mmole) in acetonitrile (0.25 mL) and 2-cyanoethyl-*N,N'*-tetraisopropyl phosphoramidite (0.095 mmole). The mixture is stirred for 30 min at room temperature. The precipitate formed is readily filtered through a glass filter and the filtrate is used in solid-phase synthesis of oligonucleotides without purification.

30

Example 2. Synthesis of methacrylamido-CPG carrier

Succinic anhydride (0.060 g, 0.3 mmole) and 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridine (DMAP, 0.037 g, 0.3 mmole) are added to solution of *N*-(2-hydroxyethyl)-*N*-{2-[di-(4-methoxyphenyl)-phenylmethoxy]ethyl}methacrylamide (0.143 g, 0.3 mmole) in dry pyridine 35 (3 mL). The mixture allows standing for 12 h at room temperature. A saturated solution of

NaHCO₃ (2 mL) is added to the mixture. A solvent is evaporated in vacuum. Residuum is dissolved in ethyl acetate (5 mL) and an organic layer is sequentially washed with saturated solution of NaHCO₃, several times with water, dried with anhydrous Na₂SO₄ and filtered. A solvent is evaporated to obtain colorless syrup. Residuum is dissolved in dry pyridine (30 mL). To the solution, 2,2'-dipyridyl disulfide (0.060 g, 0.3 mmole), triphenyl phosphine (0.079 g, 0.3 mmole), and the LCA CPG (1.00 g) are added. A suspension is concentrated in vacuum to a volume of 15 mL and held for 24 h at room temperature under periodically shaking. The suspension is filtered through a glass filter and residuum is sequentially washed with dry pyridine several times. The "capping" solution (acetic anhydride/DMAP/2,6-lutidine/acetonitrile) (10 mL) is added to the residuum washed and the mixture allows standing for 5 min. Residuum is sequentially washed with dry pyridine several times, acetone, and diethyl ether. The modified CPG-carrier is obtained having a concentration of unsaturated groups of 33.7 μ mole/g (by test to a trityl group).

Example 3. General procedure of acylation on synthesis of oligonucleotides with unsaturated groups

An acylation procedure for oligonucleotides having end-group of aliphatic amine with methacrylic acid 4-nitrophenyl ester is disclosed as an example.

The solution of methacrylic acid 4-nitrophenyl ester (3.2 micromole) in dimethylformamide (110 μ L) is added to solution of modified oligonucleotide (32.1 nanomole) comprising unprotected amine group at 5'-end (or 3'-) in a borate buffer (50 μ L, pH 9.53).

Homogeneous solution is allowed to stand overnight at 40°C. Nucleotides are separated by gel-filtration over Sephadex G25 and purified by using reverse phase HPLC. Yield exceeds 72%.

Example 4. *O*-Acylation of DNA fragments with unsaturated acid anhydrides.

A solution of methacrylic acid anhydride (15 μ L) in dimethylformamide (100 μ L) is added to a fragment of DNA (10 picomole) dissolved in H₂O (50 μ L) and cooled down to 5°C, then a solution of sodium hydroxide is added by small portions, and the pH-value being maintained at 7.0. To reaction mixture is added water (500 μ L) 15 min later, and the volume of reaction medium is brought to 50 μ L by sequential addition of some portions of anhydrous butanol. The modified DNA fragment is precipitated with a solution of lithium perchlorate in

acetone (2%, V=1000 μ L) at minus 21°C. The precipitate is centrifuged and washed with acetone.

Example 5. Amination of DNA followed by acylation with activated ester of unsaturated acid

Formic acid (80%, 20 μ L) is added to the solution of oligonucleotide or DNA fragment (39.3 nmole) in H₂O (15 μ L) and held at room temperature for 1 h. The oligonucleotide matter is further precipitated with a solution of lithium perchlorate in acetone (2%, V=1000 μ L), washed with acetone, and dried. The solution (0.5M) of ethylenediamine hydrochloride (50 μ L, pH 7.4) is added to the depurinated DNA and held for 3 h, at 37°C. Then the makeup solution of sodium hydroboride in water (15 μ L, 0.1 M) and, 30 min later, the solution of ethylenediamine hydrochloride (20%, 14.75 μ L) are added. The oligonucleotide matter is precipitated with solution of lithium perchlorate in acetone (2%, V=1000 μ L), washed with acetone and dried. Residuum is dissolved in the borate buffer (50 μ L, pH 9.3) and the solution of methacrylic acid *p*-nitrophenyl ester (0.001 g) in dimethylformamide (100 μ L) is added thereto. The solution is held for 12 h at 35°C. The modified DNA fragment is purified by gel-filtration.

Example 6. Modification of proteins at amine group

The procedure of the protein Barnase modification is set forth as an example. A solution of 6-methacryloylamino-hexanoic acid succinimide ester (20 μ L) (C=0.1 mg/mL) in dimethylformamide is added to 100 μ L of Barnase solution (C=1 mg/mL) in 0.01 M borate buffer (pH 8.3). A reaction mixture is stirred for 30 min at room temperature. The modified protein obtained is further purified of low molecular weight reaction products and of dimethylformamide over microconcentrators Nanosep 3K Omega by washing the protein with a borate buffer (pH 8.3). In 100 μ L of buffer solution, the protein purified has the final concentration of 0.9 mg/mL as defined by spectrophotometric analysis. The modified protein obtained comprises one inserted 6-methacryloylamino-hexanoic group according to MALDI-MS analysis.

The variation of ratio protein/modifying agent allows preparing a protein of various extent of modification.

Example 7. Alkylation of proteins at SH groups

The procedure of alkylation of aspartate-aminotransferase from cytosol of hen's liver with

2-acryloyloxyethyl methacrylate is set forth as an example.

A solution of 2-acryloyloxyethyl methacrylate (0.012 g, 65.2 μ mole) in dimethylformamide (3 μ L) is added to the solution of aspartate-aminotransferase (9 μ L, 3.33 mg/mL) in a buffer (25 mM HEPES, pH 8.0, 30 mM KCl, 2 mM MgCl_2) cooled down to 5°C. The homogeneous solution allows standing for 1 h and modified protein is further purified over membrane filters. The effectiveness of protein modification is controlled by an electrophoretic method. Modified protein is utilized for manufacturing protein microchips.

Synthesis of 2-acryloyloxyethyl methacrylate

Acrylic acid chloride (0.744 g, 8.22 mmole) is added to the solution of 2-hydroxyethyl methacrylate (1.070 g, 8.22 mmole) and triethylamine (0.832 g, 8.22 mmole) in tetrahydrofuran (25 mL) under vigorous stirring. The mixture is stirred at room temperature for 1 h, the precipitate formed is filtered off, and the filtrate is concentrated. Water (30 mL) is added to oil obtained and the mixture is vigorously shaken. After separation of water layer, ethyl acetate (15 mL) is added, the organic layer is dried over sodium sulfate and is evaporated in rotary evaporator under 18 mm Hg. Yield is of 81%, oil.

^1H NMR (DMSO-d_6) δ : 1.87 (s, 3H, CH_3), 3.34 (m, 2H, O-CH_2), 3.37 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O}$), 5.68 (apparent s, 1H, $\text{CH}_2=$); 6.02 (apparent s, 1H, $\text{CH}_2=$); 5.96 (dd, $J_1=10.26$ Hz, $J_2=1.87$ Hz, 1H, $\text{CH}_2=$); 6.33 (dd, $J_1=17.13$ Hz, $J_2=1.55$ Hz, 1H, $\text{CH}_2=$); 6.19 (dd, $J_1=17.13$ Hz, $J_2=10.28$ Hz, 1H, $=\text{CH-}$).

Calculated for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$: C, 58.70; H, 6.52%;

Found: C, 58.63; H, 6.64%.

Example 8. Polymerase chain reaction (PCR) over a chip

A typical PCR-experiment *in situ* is performed over a chip in special micro-camera as described earlier (Strizhkov et al., 2000). Using the copolymerization method, in different cells of chip, oligonucleotides are immobilized completely corresponding to a sequence of wild type, or oligonucleotides which comprise an oligonucleotide substitute at 3'-end. Standard PCR-solution (67 mM Tris-HCl, pH 8.6; 2.5 mM MgCl_2 ; 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.001% Triton X-100; 1 mg/mL BSA; 0.24 mM each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP; 2.5 U Taq of DNA-polymerase in 30 μ L) also contains about 10^5 copies of the genomic DNA of *Mycobacterium tuberculosis*, as well as forward (F) primer (about 1 picomole) and labeled with Texas Red at 5'-end reverse (R) primer (about 10 picomole). Usually, there are performed 35 PCR-cycles: 40 s at 95°C, 60 s at 64°C, and 40 s at 72°C. Once the PCR has

finished, the chip is washed with solution of sodium chloride (0.1–0.3 M) at 80°C consequently there remains only duplexes with elongated (due to reaction) primer over the chip, which may be detected by a fluorescent microscopy.

Fig. 5 illustrates the result of one of these experiments.

5

PCR inside of gel elements under mineral oil

A special experiment is performed to demonstrate an opportunity to realize the polymerase chain reaction totally over a chip inside of individual gel element being obtained by copolymerization method. The option of PCR over a chip under mineral oil is utilized (Tillib et al., 2001). Use is initially made of the fragmented (200-300 nucleotides), denaturized genomic DNA of *M. tuberculosis* for hybridization with the corresponding oligonucleotides over a chip as described in the experiment above. Then, after washing the DNA not involved in hybridization, the chip is incubated with the standard PCR-solution (see above) for 30 min at 55°C. Water solution is substituted with a mineral oil and PCR is performed (30 cycles): 40 s at 72°C, 40 s at 95°C, and 60 s at 64°C. Subsequent to the final step of elongation (10 min at 72°C), the biochip is carefully washed first with chloroform, then with a solution of sodium chloride (0.1–0.3 M) at 80°C, and is further examined by fluorescent microscopy.

Fig. 2 shows the result of such an experiment. One may see that allele specific PCR-reaction again proceeds quite efficiently in cells with a primer being entirely complementary to the primer of DNA used (wild type, wt, cf. cells with C4 primer). This reaction proceeds notably weaker in cells with a primer comprising an oligonucleotide substitute at 3'-end (mut, C5 primer) (Fig. 6).

25

CLAIMS

1. A method for preparing compositions (**K**) for immobilization of biological macromolecules: oligonucleotides, proteins, DNA (RNA), or any other molecules bearing unsaturated groups, characterizing in that said compositions have the following formula:

$$5 \quad \mathbf{K} = \mathbf{A}^a + \mathbf{B}^b + \mathbf{C}^c + \mathbf{D}^d + \mathbf{E}^e$$

wherein

A is acrylamide, methacrylamide, *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]acrylamide, or any other monomer based on derivatives of acrylic and methacrylic acids;

10 **B** is *N,N'*-methylenebisacrylamide, *N,N'*-1,2-dihydroxyethylenebisacrylamide, polyethyleneglycol diacrylate, a mixture thereof or other cross-linking water soluble agent;

C is a modified oligonucleotide, modified nucleic acid, protein or other molecule bearing an unsaturated group;

D is glycerol, sucrose, *N,N*-dimethylformamide, dimethylsulfoxide, polyhydric alcohols (e.g., polyvinyl alcohol), or other water soluble high-boiling compound;

15 **E** is water;

K is a composition;

a,b,c,d,e are percentages (**X**) of each ingredient in the initial composition (for solids $X = m/v \times 100\%$ and for liquids $X = v/v \times 100\%$);

$3\% \leq a+b \leq 40\%$; $0.0001\% \leq c \leq 10\%$; $0\% \leq d \leq 90\%$; $5\% \leq e \leq 95\%$,

20 and allow obtaining a high extent of immobilization of biological macromolecules by using a copolymerization in hydrogels.

2. A method of claim 1 wherein monomers (**A**, **B**) are acrylamide, methacrylamide, *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]acrylamide, *N,N'*-methylenebisacrylamide, *N,N'*-(1,2-dihydroxyethylene)bisacrylamide, polyethyleneglycol diacrylate or other water soluble
25 unsaturated compound.

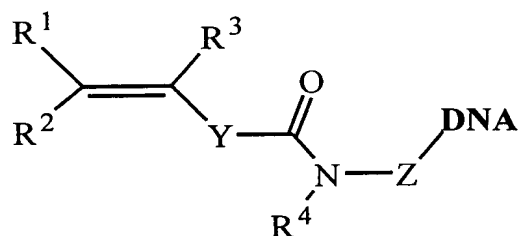
3. A method of claim 1 wherein **C** is a modified oligonucleotides, nucleic acids, proteins or other molecules bearing an unsaturated group.

4. A method of claim 1 wherein **D** is glycerol, polyvinyl alcohol, sucrose, or other water soluble high-boiling compound.

30 5. A method of claim 2 wherein the total content of monomer and cross-linking agent in the initial composition ranges from 3 to 40% ($3 < T < 40$), and the monomer to cross-linking agent ratio being in the range of 97:3-60:40% ($3 < C < 40$).

6. A method of claim 3 wherein $0.0001\% \leq c \leq 10\%$.

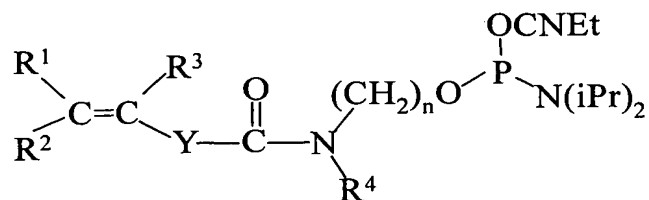
7. A method of claim 4 wherein $0\% \leq d \leq 90\%$.
8. A method of claim 1 wherein $5\% \leq e \leq 95\%$.
9. A method of claim 1 wherein a polymeric hydrogel is obtained by copolymerization of mixtures of combinations from acrylamide, methacrylamide, *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]acrylamide, *N,N'*-methylenebisacrylamide, *N,N'*-(1,2-dihydroxyethylene)-bisacrylamide, polyethyleneglycol diacrylate or other water soluble unsaturated compounds.
10. A method of claim 1 wherein hydrogels, having a predetermined pore size and improved thermal stability, are to be prepared by varying the combinations of composition ingredients.
- 10 11. A method of claim 1 wherein modified oligonucleotides have the following structure:



(I)

wherein

- 15 $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$ represent H, alkyl $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, $\text{PhCH}_2\text{-}$;
- Z is $(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CH}_2\text{OX}$ where $n = 1\text{-}6$; or $(\text{CH}_2)_n\text{-OX}$ where $n = 2\text{-}6$;
- X is a phosphodiester group binding an unsaturated moiety to 5'- and/or 3'-end of the oligonucleotide;
- R^4 represents H, $(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ where $n = 2\text{-}6$;
- 20 Y is $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$ where $n = 0\text{-}2$.
12. A method of claim 11 wherein a modification of oligonucleotides with unsaturated groups is performed in automatic conditions.
13. A method of claim 11 wherein a modification of oligonucleotides with unsaturated groups is performed by using phosphoramidite of general formula:



(II)

wherein

R^1, R^2 are H, alkyl $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, $\text{PhCH}_2\text{-}$, where $n = 2\text{-}6$;

5 R^3 is alkyl $\text{C}_1\text{-C}_6$;

R^4 represents H, $(\text{CH}_2)_n\text{-ODMT}$ where $n = 2\text{-}6$;

Y is $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$ where $n = 0\text{-}2$.

14. A method of claim 11 wherein a modification of oligonucleotides with unsaturated groups is performed in post-automatic conditions.

10 15. A method of claim 14 wherein a modification of oligonucleotides with unsaturated groups is performed by acylation of amino-linker comprising oligonucleotide with activated ester of unsaturated acid.

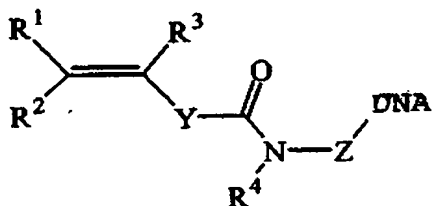
16. A method of claim 15 wherein an activated ester of unsaturated acid represents 4-nitrophenyl ester.

15 17. A method of claims 12 and 14 wherein a modification of oligonucleotides with unsaturated groups is performed at 5'-end of oligonucleotide.

18. A method of claims 12 and 14 wherein a modification of oligonucleotides with unsaturated groups is performed at 3'-end of oligonucleotide.

19. A method of claim 3 wherein modified DNA fragments are selected from formulas IV,

20 V, VI



IV

wherein:

R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Z is $(CH_2)_nCH(CH_2OH)CH_2OX$ where $n = 1-6$; or $-(CH_2)_n-OX$ where $n = 2-6$;

5 X is a phosphodiester group binding an unsaturated moiety to 5'-end and/or 3'-end of oligonucleotide;

R^4 represents H, $(CH_2)_nOH$ where $n = 2-6$;

Y is $(p-C_6H_4)_n$ where $n = 0-2$;

or



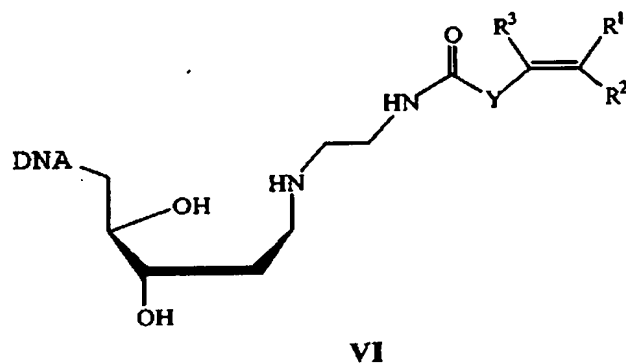
wherein

X is H, H_2PO_3 , $-CO-Y-CR^3=CR^2R^1$;

Z represents H, H_2PO_3 , $-CO-Y-CR^3=CR^2R^1$

15 R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y represents $(p-C_6H_4)_n$ where $n = 0-2$.



or

wherein:

20 R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

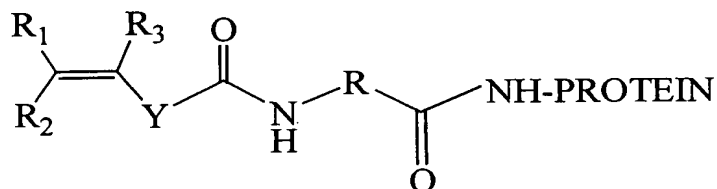
Y is $(p-C_6H_4)_n$ where $n = 0-2$.

20. A method of claim 19 wherein modified DNA fragments with formula **IV** are prepared by PCR-amplification using a synthetic primer bearing an unsaturated group at 5'-(3')-end.

21. A method of claim 19 wherein modified DNA fragments with formula **V** are prepared by direct acylation of DNA fragments with anhydrides of unsaturated acids

22. A method of claim 19 wherein modified DNA fragments with formula **VI** are prepared by amination of the DNA followed by acylation with activated esters of unsaturated acids.

23. A method of claim 3 wherein modified proteins are selected from formulas **VIII**, **X**, **XI**

**VIII**

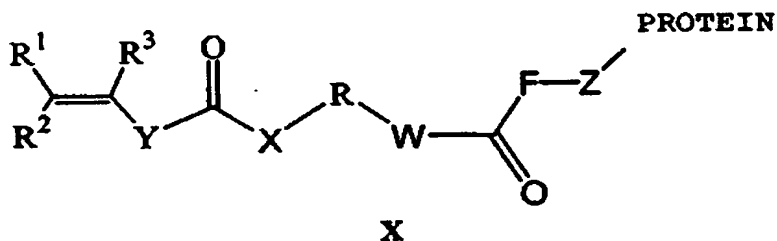
wherein

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$ are H, alkyl $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, $\text{PhCH}_2\text{-}$;

Y is $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$, where $n = 0\text{-}2$;

R is $(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, $n = 1\text{-}20$;

or

**X**

wherein

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$ are H, alkyl $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, $\text{PhCH}_2\text{-}$;

Y is $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$, where $n = 0\text{-}2$;

R is $(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, $n = 1\text{-}20$;

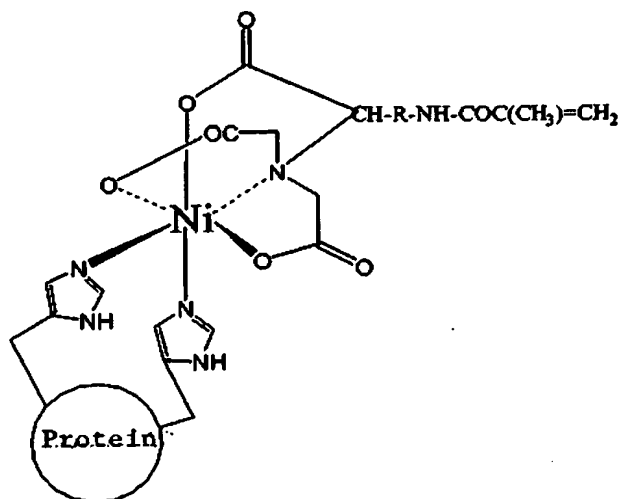
X is NH, O, S, CH_2 ;

W is NH, O, CH_2 ;

F is $(\text{CH}_2)_n$, $n=1, 2$;

Z is NH, S.

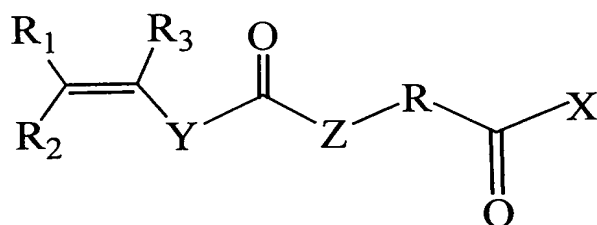
or



XI

24. A method of claim 23 wherein modified proteins with formula VIII are prepared by acylation of amino groups with activated esters of corresponding unsaturated acids.

5 25. A method of claim 24 wherein activated esters have the following structure:



VII

wherein:

R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

10 Y is $(p-C_6H_4)_n$, where $n = 0-2$;

R is $(CH_2)_n, (CH_2CH_2O)_n$, where $n = 1-20$;

X is N-hydroxysuccinimidyl-, *p*-nitrophenyloxy-, pentafluoro phenyloxy-, or any other readily leaving acceptor group;

Z is NH, O, CH_2 , S.

15 26. A method of claim 23 wherein modified proteins with formula X are prepared by alkylation of amino- or sulfhydryl groups with derivatives of α,β -unsaturated carbonyl compounds, α,β -unsaturated, and α -halocarboxylic acids

27. A method of claim 23 wherein modified proteins with formula **XI** are prepared by treatment of a His-6 recombinant protein with N-methacryoyl nitrilotriacetic acid in the presence of salts of bivalent nickel.

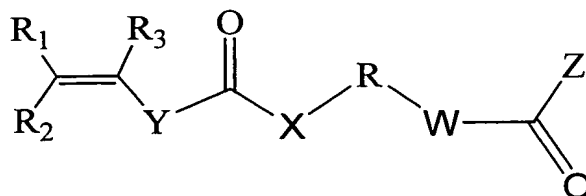
28. A method of claim 27 wherein N-methacryoyl nitrilotriacetic acid have the following structure:



XII

wherein R represents $(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, $n = 0-20$.

29. A method of claim 26 wherein α,β -unsaturated carbonyl compounds have the following structure:



IX

wherein

$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$ are H, alkyl $\text{C}_1\text{-C}_6$, Ph, PhCH_2 - ;

Y is $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$, where $n = 0-2$;

R is $(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, $n = 1-20$;

X is NH, O, S, CH_2 ;

W is NH, O, CH_2 ;

Z is a halomethyl, vinyl, succinimidyl, or any other fragment comprising an active

multiple bond.

30. A method of claim 1 wherein gel layer formed on a support is divided by empty spaces into several cells and each cell will comprise or not comprise macromolecules immobilized, and macromolecule being immobilized in various cells will have different nature and properties.

31. A method of claim 30 wherein said cells form the regular one- or two-dimensional structure (phase).

32. A method of claim 30 wherein an application of the polymerization mixture on support is carried out by using an automatic device (robot) equipped with one or more micro dispensers.

33. A method of claim 32 wherein use is made of micro dispensers of rod type.

5 34. A method of claim 32 wherein use is made of non contactless micro dispensers of jet type.

35. A method of claim 32 wherein use is made of several micro dispensers forming a regular structure.

10 36. A method of claim 30 wherein before polymerization, one or more supports including applied droplets of polymerization mixture are held in a sealed container which contains the similar polymerization mixture in amounts exceeding at least two times the aggregate volume of applied polymerization mixture.

15 37. A method of claim 30 wherein before and during polymerization, one or more supports including applied droplets of polymerization mixture are placed in a sealed container under oxygen free inert atmosphere with a controlled humidity.

38. A method of claim 37 wherein said container is filled with one of the following gases: N₂, Ar, CO₂.

20 39. A method of claim 36 wherein gaseous medium is continuously or periodically restored in the container with supports.

40. A composition for immobilization of biological macromolecules: oligonucleotides, proteins, DNA (RNA), or any other molecules bearing the unsaturated groups having the following formula:

25
$$K = A^a + B^b + C^c + D^d + E^e$$

wherein

A is acrylamide (AA), methacrylamide (MAA), *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]-acrylamide (TA), or any other monomer based on derivatives of acrylic and methacrylic acids;

30 B is *N,N'*-methylenbisacrylamide (Bis), *N,N'*-1,2-dihydroxyethylenebisacrylamide (DHEBA), polyethyleneglycol diacrylamide (PEGDA), a mixture thereof or any other cross-linking water soluble agent;

C is a modified oligonucleotide, modified nucleic acid, protein or other molecule bearing an unsaturated group;

D is glycerol, sucrose, *N,N*-dimethylformamide, dimethylsulfoxide, polyhydric alcohols (e.g., polyvinyl alcohol), or other water soluble high-boiling compound;

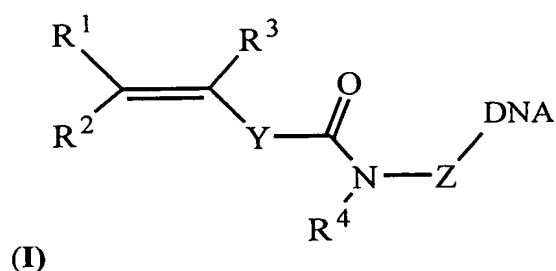
E is water;

K is a composition;

5 **a,b,c,d,e** are percentages (X) of each ingredient in the initial composition (for solids $X = m/v \times 100\%$ and for liquids $X = v/v \times 100\%$);

$3\% \leq a+b \leq 40\%$; $0.0001\% \leq c \leq 10\%$; $0\% \leq d \leq 90\%$; $5\% \leq e \leq 95\%$.

41. A modified oligonucleotides of the following structure:



10 wherein

R^1, R^2, R^3 represent H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

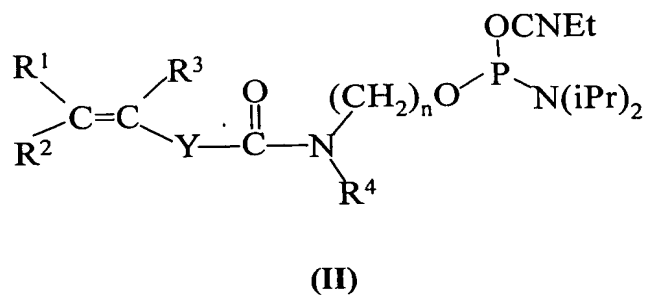
Z is $(CH_2)_nCH(CH_2OH)CH_2OX$ where $n = 1-6$; or $(CH_2)_n-OX$ where $n = 2-6$;

X is a phosphodiester group binding an unsaturated moiety to 5'- and/or 3'-end of the oligonucleotide;

15 R^4 represents H, $(CH_2)_nOH$ where $n = 2-6$;

Y is $(p-C_6H_4)_n$ where $n = 0-2$.

42. Phosphoramidites of general formula:



20

wherein

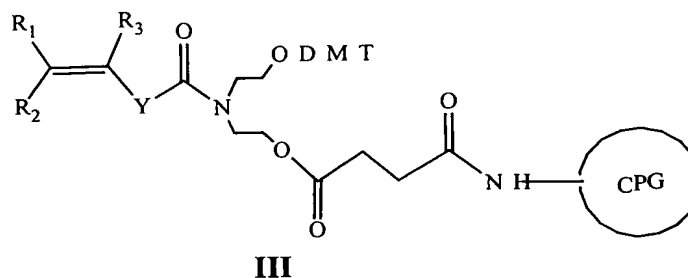
R^1, R^2 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$, where $n = 2-6$;

R^3 is alkyl C_1-C_6 ;

R^4 represents H, $(CH_2)_nODMT$ where $n = 2-6$;

Y is (*p*-C₆H₄)_n where n = 0-2.

43. A carrier porous glass (CPG) of the following structure:



5 wherein:

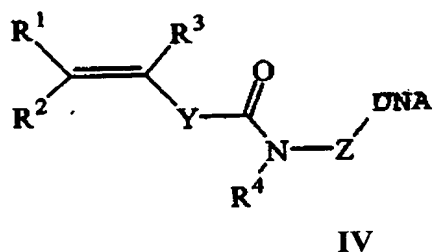
R¹, R² are H, alkyl C₁-C₆, Ph, PhCH₂-;

R³ is alkyl C₁-C₆;

Y is (*p*-C₆H₄)_n, where n = 0-2.

44. A modified DNA fragments of the following structure:

10



wherein:

R¹, R², R³ are H, alkyl C₁-C₆, Ph, PhCH₂-;

15 R⁴ represents H, (CH₂)_nOH where n = 2-6;

Y is (*p*-C₆H₄)_n where n = 0-2;

Z is (CH₂)_nCH(CH₂OH)CH₂OX where n = 1-6; or -(CH₂)_n-OX where n = 2-6;

X is a phosphodiester group binding an unsaturated moiety to 5'- and/or 3'-end of the oligonucleotide,

20 or



(V)

wherein

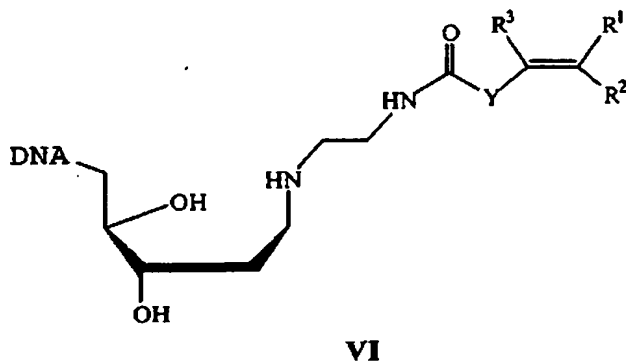
X is H, H₂PO₃, -CO-Y-CR³=CR²R¹;

25 Z represents H, H₂PO₃, -CO-Y-CR³=CR²R¹

R¹, R², R³ are H, alkyl C₁-C₆, Ph, PhCH₂-;

Y represents $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$ where $n = 0-2$.

or

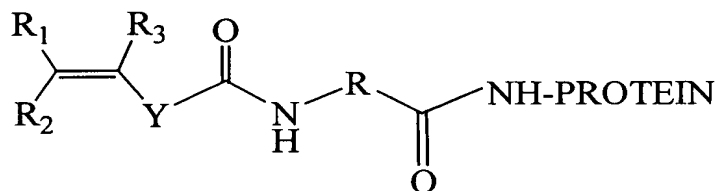


wherein:

5 R^1, R^2, R^3 are H, alkyl $C_1\text{-}C_6$, Ph, $\text{PhCH}_2\text{-}$;

Y is $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$ where $n = 0-2$.

45. A modified proteins of the following structure:



10

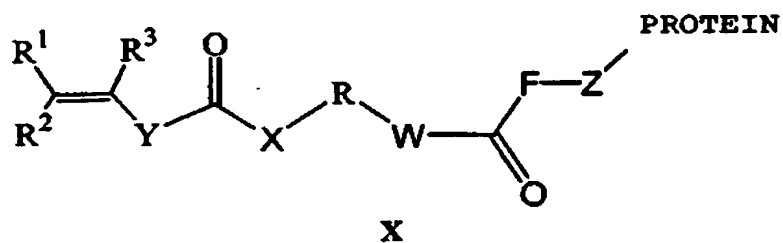
wherein

R^1, R^2, R^3 are H, alkyl $C_1\text{-}C_6$, Ph, $\text{PhCH}_2\text{-}$;

Y is $(p\text{-C}_6\text{H}_4)_n$, where $n = 0-2$;

R is $(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, $n = 1-20$;

15 or



wherein

R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y is $(p-C_6H_4)_n$, where $n = 0-2$;

R is $(CH_2)_n$, $(CH_2CH_2O)_n$, $n = 1-20$;

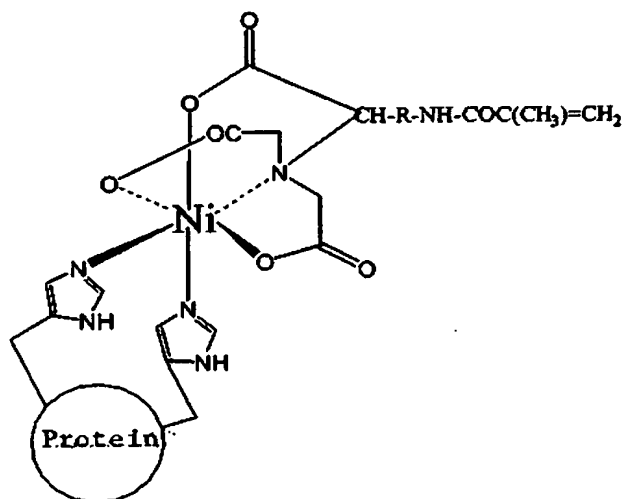
X is NH, O, S, CH_2 ;

W is NH, O, CH_2 ;

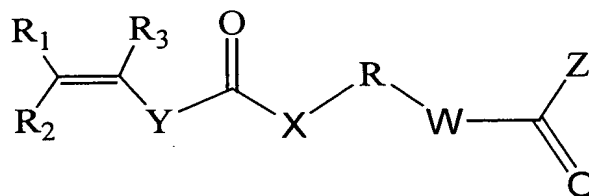
F is $(CH_2)_n$, $n=1, 2$;

Z is NH, S.

or



46. α,β -Unsaturated carbonyl compounds of the following structure:



IX

wherein

R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

Y is $(p-C_6H_4)_n$, where $n = 0-2$;

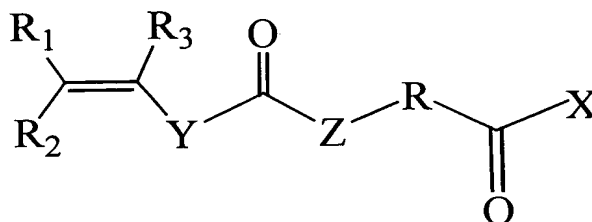
5 R is $(CH_2)_n, (CH_2CH_2O)_n, n = 1-20$;

X is NH, O, S, CH_2 ;

W is NH, O, CH_2 ;

Z is a halomethyl, vinyl, succinimidyl, or any other fragment comprising an active multiple bond.

10 47. Activated esters of the following structure:



VII

wherein:

R^1, R^2, R^3 are H, alkyl C_1-C_6 , Ph, $PhCH_2-$;

15 Y is $(p-C_6H_4)_n$, where $n = 0-2$;

R is $(CH_2)_n, (CH_2CH_2O)_n$, where $n = 1-20$;

X is N-hydroxysuccinimidyl-, *p*-nitrophenyloxy-, pentafluoro phenyloxy-, or any other readily leaving acceptor group;

Z is NH, O, CH_2 , S.

20

48. N-Methacryoyl nitrilotriacetic acid of the following structure:



wherein R represents $(CH_2)_n, (CH_2CH_2O)_n, n = 0-20$.

49. A method for performing the PCR-amplification of specific DNA fragments wherein said amplification proceeds both over and inside of plurality of gel cells of microchip being prepared by a copolymerization method comprising the following steps:

- (a) preparation of microchip having a specific sets of oligonucleotides (primers) being immobilized by method of copolymerization in certain addresses (three-dimensional isolated gel cells) of the chip;
- (b) addition of solution comprising an amplification buffer, primers, and nucleic acids under investigation;
- (c) carrying out the PCR-amplification by method of thermo cycling treatment to result in forming numerous amplification products and in performing an allele specific elongation of primers immobilized.

50. A method for performing the PCR-amplification of specific DNA fragments wherein said amplification proceeds inside of plurality of microchip's gel cells surrounded with a hydrophobic liquid, which microchip is prepared by a copolymerization method comprising the following steps:

- (a) preparation of chip having a specific sets of primers being immobilized by method of copolymerization inside each of gel cells;
- (b) addition of solution comprising nucleic acids under investigation and nucleic acids under investigation and performing a hybridization of said nucleic acids with primers immobilized inside of gel cells;
- (c) replacement of hybridization solution with the amplification solution;
- (d) replacement of water amplification solution with the hydrophobic liquid (mineral oil) which completely isolates chip cells with each other and surrounds each of cells;
- (e) performing a PCR-amplification inside each of gel cells by method of thermo cycling treatment.

ABSTRACT

The present invention refers to the field of molecular biology and bioorganic chemistry and deals with compositions for immobilization of modified oligonucleotides, proteins, nucleic acids or any other molecules bearing the unsaturated groups in a hydrogel, in manufacturing microchips by method of photo-initiated copolymerization. The invention also refers to the technology for manufacturing microchips and to performing a polymerase chain reaction (PCR) over a chip having an application in molecular biology for sequencing and mapping of DNA, detection of mutations, and in a whole lot of medical applications.